



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA-PPGAQI

Elen Monique de Oliveira Sousa

Efeito da técnica de “água verde” no desempenho zootécnico, na composição de ácidos graxos e na morfologia intestinal de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933

Florianópolis
2024

Elen Monique de Oliveira Sousa

Efeito da técnica de “água verde” no desempenho zootécnico, na composição de ácidos graxos e na morfologia intestinal de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura- PPGAQI da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Aquicultura

Orientadora: Profa., Mônica Yumi Tsuzuki, Dra

Florianópolis
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Sousa, Elen Monique de Oliveira

Efeito da técnica de "água verde" no desempenho zootécnico, na composição de ácidos graxos e na morfologia intestinal de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933 / Elen Monique de Oliveira Sousa ; orientadora, Mônica Yumi Tsuzuki, 2024.

69 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Larvicultura. 3. Microalgas. 4. Cavalo-marinho. 5. Alimentação. I. Tsuzuki, Mônica Yumi . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Aquicultura. III. Título.

Elen Monique de Oliveira Sousa

Efeito da técnica de “água verde” no desempenho zootécnico, na composição de ácidos graxos e na morfologia intestinal de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado, em 12 de dezembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Vieira Rodrigues, Dr.
Universidade Federal do Rio Grande

Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em aquicultura

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Mônica Yumi Tsuzuki, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2024

Este trabalho é dedicado aos meus avós Manoel e Tarcila e á minha mãe
Cirlene de Oliveira Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha pessoa, por ser resistente e resiliente durante o período do doutorado, pois estes quatro anos foram desafiadores, gratidão à deus e aos meus guias pela sabedoria e discernimento que me fizeram continuar a trilhar meu caminho.

Agradeço a minha família, em especial à minha mãe Cirlene de Oliveira Cruz, por todo amor, confiança e apoio durante toda essa trajetória e por todo o mais que sempre tem feito, agradeço à minha vó Tarcila de Oliveira Cruz por todo conhecimento e ensinamento repassado desde minha infância.

Agradeço à segunda família e aos amigos que aqui em Florianópolis- SC, foram construídos, à Duana Balbinot, Hugo Leonardo, Felipe, Aguida Aurea, Elenice Brasil e à Ianka Agra pela irmandade, por ser família, amiga, irmã, aluna de iniciação científica, agradeço por toda troca e laços que foram construídos, por toda força, carinho, amizade, lealdade e respeito.

Agradeço a vida dos meus peludinhos de quatro patas (Frajola, Snow, Iris, Amora e Chocolate) por todo amor, pureza e alegria que transmitem.

A família Lapom (Laboratório de Peixes Ornamentais Marinhos), em especial a Tânia Maria, Jorgélia, João Rodolfo, Nayara de Oliveira pela relação de amizade e respeito que construímos, com toda certeza vocês deixaram a caminhada mais leve. A Renata, que é muito mais que técnica do Lapom é nossa “mãezona”, nossa acolhedora, a luz que brilha e ilumina os dias mais difíceis, sempre com uma palavra de amor e esperança de que vai da tudo certo, obrigada por cada abraço, lágrimas e risos compartilhados. À minha orientadora, professora Mônica, pela oportunidade oferecida, orientação, apoio e confiança.

Agradeço a parceria dos professores e laboratórios LAPMAR, LMM, AQUOS, LCA por toda ajuda, sejam elas com conhecimento aplicado, ou como microalgas e alimentos vivos para a realização dos experimentos

Ao Prof. Roberto Bianchini Derner e a sua equipe do Laboratório de cultivo de algas (LCA-UFSC) pela contribuição no presente estudo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura-PPGAQI, que não mediram esforços para transmitir conhecimento, ao Carlito, que sempre esteve disposto a ajudar com os problemas administrativo do doutorado.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo fomento da bolsa de estudo.

Agradeço a incrível oportunidade de trabalhar mais de pertinho com os cavalos-marinhos, que animais incríveis, com certeza agregaram muito conhecimento a mim, simplesmente por serem cavalos-marinhos.

Todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho, meu muito OBRIGADA!!!

RESUMO

O objetivo da tese foi desenvolver e aprimorar as técnicas de larvicultura do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* através da adição de microalgas na água de cultivo, técnica conhecida como “água verde” visando maximizar a sobrevivência e o desempenho zootécnico. Para isso foram testados quatro tratamentos compostos por duas microalgas (*Tisochrysis lutea*- ISO e *Chaetoceros muelleri*-CHO), utilizadas sozinhas (TISO e TCHO) ou combinadas (TIC, 1:1) na água de cultivo larval, e um tratamento sem as microalgas (TSM) durante os primeiros 15 dias de vida dos cavalos-marinhos. As larvas foram alimentadas do primeiro ao sétimo dia com copépode (*Parvocalanus crassirostris*; 2 ind mL⁻¹) e rotíferos (*Brachionus rotundiformis*; 8 ind mL⁻¹), e a partir do oitavo dia foi feita a inclusão gradual de náuplios de *Artemia* sp. (2 ind mL⁻¹). No primeiro experimento foram verificadas sua influência no desempenho e na composição lipídica das larvas, e no segundo foram utilizadas as análises de desempenho zootécnico e histologia do trato digestório das larvas de cavalo-marinho nos diferentes tratamentos com ou sem a adição de microalgas durante os primeiros 15 dias. Os resultados nos mostraram que não houve diferenças significativas entre as taxas de sobrevivência ao final do experimento nos tratamentos com e sem microalga na água de cultivo (77,3 a 88,0%), a adição das microalgas, especificamente de *T. lutea* nos tratamentos TISO e TIC, afetou positivamente e significativamente o peso (~ 25,69 mg), o ganho de peso (~11,41 mg), a taxa de crescimento específico (~16,78% dia⁻¹) e o fator de condição das larvas (0,36) em relação ao TSM (20,91mg; 9,14 mg; 15,45% dia⁻¹; 0,31, respectivamente) (P<0,05). Uma maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), de ácido docosahexaenóico (DHA), \sum n-3, razão n-3/n-6 foram encontrados nas larvas do TISO após os 15 dias de cultivo (P<0,05). A análise histológica do trato digestório mostra claramente que as larvas do TISO apresentaram maiores valores de altura das vilosidades intestinais (85,29±1,23 µm) quando comparadas com as larvas do TSM (69,42±2,82 µm) e TCHO (76,92±2,23 µm), mas não mostrou diferenças significativas quando comparadas com o TIC (80,127± 2,08 µm). Isso refletiu diretamente na área da superfície das vilosidades, onde as larvas do TISO (3.603,43±151,31 µm) e do TIC (3.550,29±120,99 µm) apresentaram valores maiores e significativos em relação ao TSM (3.026,79±147,64 µm) e o TCHO (3.069,09±126,18 µm) (P<0,05). A adição de microalgas na água de cultivo, especificamente a *T. lutea* durante os primeiros 15 dias de vida do cavalo-marinho, *H. reidi*, mostrou ser uma alternativa vantajosa em sistema intensivo, visto que sua inclusão afetou positivamente o desempenho das larvas em comparação ao tratamento sem adição da microalga. Os resultados encontrados neste estudo servem de base para a elaboração de técnicas de manejo para a larvicultura de cavalos-marinhos

Palavras-chave: Aquicultura, Larvicultura, Microalgas, Cavalo-marinho, Alimentação

ABSTRACT

The objective of this study was to develop and improve larviculture techniques for the seahorse *Hippocampus reidi* through the addition of microalgae to the rearing water, a technique known as “green water” aiming to maximize survival and zootechnical performance. For this, four treatments were tested, consisting of two microalgae (*Tisochrysis lutea*- ISO and *Chaetoceros muelleri*-CHO), used alone (TISO and TCHO) or combined (TIC, 1:1) in larval cultivation water, and a treatment without microalgae (TSM) during the first 15 days of seahorse's life. Larvae were fed from the first to the seventh day with copepods (*Parvocalanus crassirrostris*; 2 ind mL⁻¹) and rotifers (*Brachionus rotundiformis*; 8 ind mL⁻¹), and from the eighth day onwards, *Artemia* sp. nauplii (2 in mL⁻¹). In the first experiment, its influence on the performance and lipid composition of the larvae was verified; in the second, analyzes of zootechnical performance and histology of the digestive tract of larvae were used in the different treatments with or without the addition of microalgae during the first 15 days. Although no significant differences in the survival rates were observed at the end of the experiment in the treatments with or without microalgae in the rearing water (77.3 to 88.0%), the addition of microalgae, specifically *T. lutea* in the TISO and TIC treatments, positively and significantly affected weight (~ 25.69 mg), weight gain (~11.41 mg), specific growth rate (~16.78% day⁻¹) and condition factor of the larvae (0.36) in relation to TSM (20.91mg; 9.14 mg; 15.45% day⁻¹; 0.31, respectively) (P<0.05). A higher concentration of polyunsaturated fatty acid (PUFA), docosahexaenoic acid (DHA), \sum n-3, n-3/n-6 ratio were found in TISO larvae after 15 days of cultivation (P<0.05). The histological analysis of the digestive tract of the larvae clearly shows that the TISO larvae presented higher height values of villi (85.29±1.23 μ m) when compared to the TSM larvae (69.42±2.82 μ m) and TCHO (76.92±2.23 μ m) but did not show significant differences when compared with TIC (80.127± 2.08 μ m). This fact directly reflected in the surface area of the villi, where larvae of the TISO (3,603.43±151.31 μ m) and TIC (3,550.29±120.99 μ m) presented higher and significant values in relation to TSM (3,026.79±147.64 μ m) and TCHO (3,069.09±126.18 μ m) (P <0.05). The addition of microalgae to the rearing water, specifically *T. lutea* during the first 15 days of the life of *H. reidi* proved to be an advantageous alternative intensive system production system, once its inclusion positively affected the performance of larvae in comparison to the treatment without the addition of microalgae. The results found in this study serve as a basis for the development of management techniques for seahorse larviculture.

Key words: Aquaculture, Larviculture, Microalgae, Seahorse, Feeding

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1.

- Tabela 1. Perfil de ácidos graxos dos copépodes (*Parvocalanus crassirostris*), dos rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) enriquecidos e dos náuplios de artêmia utilizados como alimento vivo durante os 15 dias de larvicultura de *Hippocampus reidi*. 26
- Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Tisochrysis lutea* e *Chaetoceros muelleri*. 28
- Tabela 3. Sobrevivência (média ± DP) de larvas de *Hippocampus reidi* com 15 dias submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri* 32
- Tabela 4. Parâmetros zootécnicos de larvas de *Hippocampus reidi* com 15 dias submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC - adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. 33
- Tabela 5. Perfil de ácidos graxos das larvas de *Hippocampus reidi* após 15 dias de cultivo nos tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO - adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO - adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC - adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. 34

ARTIGO 2.

- Tabela 1. Parâmetros zootécnicos de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* com 7 e 15 dias submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO - adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC - adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. ... 51

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1.

Figura 1. Peso (média \pm DP) de larvas de *Hippocampus reidi* com 15 dias submetidos a diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea*+ *Chaetoceros muelleri*. 32

ARTIGO 2.

Figura 1. Altura das vilosidades (μm) (média \pm DP) de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade ($P < 0,05$).....52

Figura 2. Largura das vilosidades (μm) (média \pm DP) de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade ($P < 0,05$).....52

Figura 3. Área da superfície das vilosidades(μm) (média \pm DP) de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma idade ($P < 0,05$)..... 53

Figura 4. Microfotografias do intestino de juvenis do cavalo marinho *Hippocampus reidi* com 15 dias nos diferentes tratamentos com ou sem microalgas (A)-TSM - sem adição de microalgas;(B)-TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*, (C)-TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; (D)-TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros mueller* 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species
DHA	Ácido Docosahexaenóico
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
IUCN	Internacional Union for Conservation of Nature
FC	Fator de Condição
GP	Ganho de Peso
MUFAS	Ácidos graxos monoinsaturados
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
TCHO	Tratamento <i>Chaetoceros mullieri</i>
TISO	Tratamento <i>Tisochrysis lutea</i>
TIC	Tratamento (<i>Tisochrysis</i> + <i>Chaetoceros</i>)
TSM	Tratamento Sem Microalga
SFA	Ácidos graxos saturados
TCE	Taxa de Crescimento Específico
TDE	Taxa de Desenvolvimento Específico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1.1	<i>Indústria da aquariofilia e cavalos-marinhos</i>	13
1.1.2	<i>Hippocampus reidi</i>	14
1.1.3	<i>Sistema digestório e nutrição de larvas</i>	15
1.1.4	<i>Larvicultura e “água verde”</i>	17
1.2	OBJETIVOS	19
1.2.1	<i>Objetivo geral</i>	19
1.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	19
1.3	ESTRUTURA DA TESE	19
2	ARTIGO 1.	20
2.1	INTRODUÇÃO	22
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	23
2.2.1	<i>Local de estudo</i>	23
2.2.2	<i>Origem e aclimação dos reprodutores</i>	24
2.2.3	<i>Cultivo de alimento vivo</i>	24
2.2.4	<i>Cultivo de microalgas</i>	27
2.2.5	<i>Delineamento e Procedimento Experimental</i>	28
2.2.6	<i>Análise de ácidos graxos</i>	29
2.6.	<i>Desempenho zootécnico</i>	30
2.2.7	<i>Análise estatística</i>	31
2.3	RESULTADOS	31
2.3.1.	<i>Sobrevivência e desempenho zootécnico</i>	31
2.3.2.	<i>Perfil de ácido graxos das larvas de Hippocampus reidi após 15 dias</i>	33
2.4	DISCUSSÃO	35
2.5	CONCLUSÃO	37
2.6	REFERÊNCIAS	37
3	ARTIGO 2.	43
3.1	INTRODUÇÃO	45
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.2.1	<i>Local de estudo</i>	46
3.2.2	<i>Origem e aclimação dos reprodutores</i>	47
3.2.3	<i>Cultivo de alimento vivo</i>	47

3.2.4	<i>Cultivo de microalgas</i>	48
3.2.5	<i>Delineamento e Procedimento Experimental</i>	48
3.2.6	<i>Desempenho zootécnico</i>	49
3.2.7	<i>Análise histológica</i>	49
3.2.8	<i>Análise estatística</i>	50
3.3	RESULTADOS	50
3.3.1	<i>Crescimento e ganho de peso das larvas</i>	50
3.3.2	<i>Análise Histológica</i>	51
3.4	DISCUSSÃO	54
3.5	CONCLUSÃO	56
3.6	REFERÊNCIAS	56
4.	CONCLUSÕES GERAIS	60
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL	61
	APÊNDICES	67

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 Indústria da aquariorfilia e cavalos-marinhos

Estima-se que aproximadamente 700 espécies de animais marinhos são destinadas ao mercado de ornamentais marinhos, entre eles 35 milhões de peixes e 10 milhões de invertebrados (OLIVOTTO et al., 2011; PALMTAG, 2017). Esse comércio tem como alvo uma quantidade e diversidade de espécies de peixes de recifes, compondo uma importante fonte de renda para países coletores e exportadores, especialmente países do Sudeste Asiático (LEAL et al., 2016). Dentre os países exportadores destacam-se a Indonésia, Filipinas, Brasil, Maldivas, Vietnã, Sri Lanka e o estado americano do Havaí, e entre os maiores importadores destacam-se EUA e a União Européia, sendo o *H. kuda* e *H. reidi* as principais espécies comercializadas (FOSTER et al., 2016).

A realidade extrativista e o grande número de animais capturados, juntamente com a inexistência de um controle efetivo pelas autoridades sobre a captura e o comércio de peixes ornamentais marinhos, levam ao alto risco de sobreexploração dos recursos naturais, demonstrando a insustentabilidade desta atividade (WOOD, 2001; MONTEIRO-NETO et al., 2003; GASPARINI et al., 2005).

A exportação de cavalos-marinhos engloba um total de 80 países, com um volume anual de 20 milhões de indivíduos, mas apenas 6 milhões relatados pela Convenção de Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Extinção (CITES), sendo que 97% desse volume são capturadas de forma não seletiva do ambiente natural (FOSTER et al., 2016). O Brasil é um dos maiores exportadores de organismos vivos no comércio internacional, e o cavalo-marinho está entre os peixes mais exportados pelo país (CITES, 2017). Grande parte da sua captura é destinada ao comércio ornamental, artesanato e à medicina tradicional chinesa (MAI; ROSA, 2009).

Devido à perda de habitat e a elevada pressão de coleta de cavalos-marinhos no ambiente natural, o que levaram a sobre-exploração dos estoques pesqueiros, todas as espécies de cavalos-marinhos encontram-se na lista de espécies ameaçadas (ICMBio, 2018) e na lista de espécies vulneráveis pela Internacional Union for Conservation of Nature – IUCN (IUCN, 2019).

Cavalos-marinhos são peixes teleósteos do gênero *Hippocampus*, família Syngnathidae, encontrados geralmente em águas rasas, regiões tropicais e temperadas (LOURIE et al., 1999, 2004). Apresentam a cabeça formando um ângulo em relação ao eixo

longitudinal do corpo, trato digestório sem estômago diferenciado, anéis ósseos ao redor do tronco e da cauda, e uma cauda preênsil para se agarrar ao substrato (FOSTER; VINCENT, 2004). Os machos apresentam uma bolsa incubadora, chamada de “pseudoplacenta”, análoga a placenta de mamíferos (KAWAGUCHI et al., 2017, WHITTINGTON; FRIESEN, 2020), local onde ocorre a fusão com os órgãos fetais para que as trocas fisiológicas (como iônicas, osmóticas e de nutrientes) entre o embrião e pai ocorram (LINTON, SOLOFF, 1964; LAKSANAWIMOL; DAMRONGPHOL; KRUATRACHUE, 2006).

Diferente de outros peixes, os cavalos-marinhos em seu ambiente natural permanecem grande parte da vida adulta associados a substratos bentônicos devido à sua limitada capacidade de natação, os quais são de extrema importância para sua sobrevivência, já que fornecem proteção contra possíveis predadores (LOURIE et al., 1999; FRERET-MEURER et al., 2012; HARASTI et al., 2014).

1.1.2 Hippocampus reidi

Segundo Silveira et al. (2014), no Brasil, ocorrem três espécies de cavalos-marinhos: *Hippocampus erectus*, *H. patagonicus* e o *H. reidi*.

Segundo Bailly (2008), a classificação sistemática do *H. reidi*

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Subfilo: Vertebrata

Classe: Actinopterygii

Subclasse: Pisces

Ordem: Gasterosteiformes

Família: Syngnathidae

Gênero: *Hippocampus*

Espécie: *Hippocampus reidi*

Hippocampus reidi é uma das espécies do gênero mais difundidas em aquários públicos e um dos cavalos-marinhos mais procurados no comércio internacional de aquários (BULL; SHEDD, 2002; ROSA; SAMPAIO; BARROS, 2006).

Das três espécies que ocorrem no Brasil, *H. reidi* é a mais comum (ROSA et al., 2007). No entanto, devido a pressão da pesca, destruição do habitat natural e utilização na medicina tradicional, suas populações diminuíram nos últimos 30 anos (COSTA-NETO, 2000; ROSA et al., 2005; 2011), levando a sua inclusão na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN

(OLIVEIRA & POLLOM, 2017) como Quase Ameaçada (NT) e no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada como vulnerável (ICMBio, 2018).

Conhecido como o cavalo-marinho-do-focinho-longo, *H. reidi* exibe uma extensa tonalidade de cores, variando de marrom, marrom-avermelhado ao amarelo. Distribui-se do litoral do Amapá até Rio Grande do Sul (LOURIE et al., 1999, ROSA et al., 2007), sendo encontrado principalmente em áreas rasas e costeiras, como estuários, recifes, manguezais e bancos de algas (ROSA et al., 2007; FREITAS; VELASTIN, 2010; FRERET-MEURER et al., 2018), em profundidades entre 15 e 55 m e geralmente em pequenos grupos de até no máximo quatro indivíduos (VARI, 1982; ROSA, 2002).

Em relação ao seu desenvolvimento, cavalos-marinhos ao nascer já apresentam alguns sistemas altamente desenvolvidos como o visual e o locomotor, enquanto outros, como o digestório, o circulatório e o respiratório, aumentam a funcionalidade gradualmente com o seu crescimento (FOSTER; VINCENT, 2004; NOVELLI et al. 2015, SILVEIRA et al., 2016; FRERET-MEURER et al., 2018). A primeira maturação sexual de *H. reidi* em ambiente natural ocorre aproximadamente aos 7 meses de idade e a primeira reprodução acontece aproximadamente aos 10 meses (SILVEIRA, 2005; ROSA et al., 2007; MAI; ROSA, 2009). Em cativeiro, o início da maturidade sexual ocorre entre 60 e 90 dias de idade e a gestação pode durar entre 14 a 21 dias, dependendo da temperatura (LOURIE et al., 1999; SILVEIRA, 2000; ROSA et al., 2002; HORA; JOYEUX, 2009).

Vários estudos já vem sendo realizados com a espécie, como o fechamento do ciclo de vida em cativeiro desde o nascimento até a fase adulta (HORA, JOYEUX 2009), a influência de parâmetros como a salinidade (HORA et al., 2016), cor do tanque (HORA et al., 2017), densidade de estocagem (OLIVOTTO et al., 2008), efeito da dieta no desenvolvimento inicial (RANDAZZO et al., 2018), utilização do copépode selvagem e artêmia suplementada com pancreatina suína na larvicultura (SOUZA et al., 2020). Entretanto, existe uma série de entraves a fim de melhorar as condições de cultivo do *H. reidi* para torná-la uma espécie comercialmente viável, e um dos principais obstáculos na produção é a baixa taxa de sobrevivência de larvas e juvenis, devido principalmente à alimentação e à nutrição (OLIVOTTO et al., 2008).

1.1.3 Sistema digestório e nutrição de larvas

Novelli et al. (2015) estudando a ontogenia do *H. reidi*, relatam que os animais nascem com o sistema digestório pouco desenvolvido e que gradualmente aumentam sua funcionalidade, e sugerem quatro fases de desenvolvimento, desde o nascimento até 30 dias

após o nascimento. O primeiro estágio compreende o período do nascimento até o 2º dia de vida, onde há a presença do saco vitelínico. O segundo estágio, de 3 a 8 dias após o nascimento, compreende a fase em que os animais ainda possuem o intestino com estrutura retilínea e o saco vitelínico, e as vesículas supranucleares do intestino posterior são reabsorvidas gradativamente. Na terceira fase, entre 9 e 18 dias após o nascimento, são observadas as maiores mudanças, uma delas é a passagem do comportamento pelágico para bentônico e a progressiva formação de alças intestinais. Na quarta fase, entre o 20º e 30º dia de vida, os animais aumentam de tamanho, melhoram a capacidade preênsil da cauda, mantendo todas as características morfológicas internas do terceiro estágio.

O intestino é um órgão envolvido em importantes funções fisiológicas, sendo o principal local de digestão dos alimentos e absorção de nutrientes (CABALLERO et al., 2003). O conhecimento básico da fisiologia digestiva dos peixes é fundamental para o desenvolvimento de dietas que atendam às exigências nutricionais das espécies cultivadas (GONÇALVES et al., 2012). As exigências nutricionais e os padrões de alimentação adequados ainda são lacunas importantes para o cultivo de cavalos-marinhos em grande escala. Desta forma, um dos principais fatores que afetam positivamente a sobrevivência larval é a nutrição adequada, a qual está diretamente relacionada com a ingestão, digestão e assimilação dos nutrientes essenciais necessários do alimento oferecido (LAZO et al., 2007; OLIVOTTO et al., 2011).

Lovett (1969), analisando o conteúdo estomacal de *H. abdominalis* encontrou copépodes, anfípodes, misidáceos, decápodes e larvas de peixes, sendo que para *H. erectus*, anfípodes foram dominantes (TEIXEIRA; MUSICK, 2001). Quanto ao hábito alimentar do *H. reidi* na natureza, alguns autores relataram que os crustáceos (copépodes, anfípodes, carídeos e misidáceos) e nematódeos, são os principais componentes da dieta (FOSTER; VINCENT, 2004; CASTRO et al., 2008; OLIVOTTO et al., 2008; STORERO; GONZÁLEZ, 2008; HORA; JOYEUX, 2009).

Desta forma, baseado nos estudos que descrevem a alimentação natural dos cavalos-marinhos, são considerados peixes de hábito alimentar carnívoro. Em cativeiro, a alimentação na larvicultura de *H. reidi* é basicamente composta por rotíferos, náuplios de artêmia e copépodes, porém muitos desses alimentos não atendem as suas exigências nutricionais (PAYNE; RIPPINGALE, 2000). Em trabalhos realizados com *H. reidi*, e outras espécies de cavalos-marinhos, observou-se um trato digestório pouco desenvolvido, sem um estômago diferenciado (NOVELLI et al., 2015; SOUZA et al., 2020) e baixa atividade de enzimas

digestivas (SOUZA et al., 2020), o que dificulta a digestão do alimento, especialmente em recém-nascidos.

1.1.4 Larvicultura e “água verde”

H. reidi ainda é uma espécie de difícil criação devido principalmente à alimentação e à nutrição, especialmente na primeira alimentação (OLIVOTTO et al., 2008). Normalmente, no cultivo de peixes marinhos são utilizados rotíferos e artêmia como principais itens alimentares nas fases iniciais do cultivo (FOSTER; VINCENT 2004; KOLDEWEY; MARTIN-SMITH, 2010; OLIVOTTO et al., 2011). Entretanto, náuplios de artêmia apresentam baixa digestibilidade (PAYNE; RIPPINGALE, 2000; OLIVOTTO et al., 2011), o que ainda é agravado pelo fato de o cavalo-marinho possuir trato intestinal simples, sem estômago funcional, dificultando assim a sua digestão (PALMA et al., 2014).

Além disso, estes alimentos muitas vezes não atendem as exigências nutricionais, especialmente de cavalos-marinhos. Rotíferos e artêmia apresentam níveis naturalmente baixos de ácidos graxos essenciais altamente insaturados, como o ácido eicosapetaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), por isso necessitam de enriquecimento com microalgas vivas ou secas, concentrado de óleo de peixe auto-emulsificado ou enriquecedores comerciais para aumentar o seu valor nutricional (PAYNE; RIPPINGALE 2000; SORGELOOS et al. 2001; PALMA et al. 2011; FIGUEIREDO et al. 2012). É sabido que, o DHA e EPA têm papéis importantes na manutenção da fluidez da membrana, durante o desenvolvimento larval. O DHA é preferencialmente incorporado ao tecido nervoso e quando fornecido em quantidades adequadas promove o desenvolvimento e maturação do sistema digestório, crescimento, sobrevivência e morfogênese normal (ZAMBONINO INFANTE; CAHU, 1999; CAHU et al., 2003, VILLENEUVE et al., 2005), enquanto sua deficiência pode induzir a estresse fisiológico (LUND et al., 2012).

Alguns trabalhos já demonstraram que a utilização de enriquecedores no alimento-vivo proporcionaram uma boa sobrevivência e crescimento em *H. abdominalis* (WOODS, 2005; MARTINEZ-CARDENAS; PURSER, 2007), *H. guttulatus* (PALMA; BUREAU; ANDRADE, 2011) e *H. hippocampus* (LENOIR et al., 2008). Apesar do enriquecimento do alimento-vivo suprir à quantidade de ácidos graxos altamente insaturados necessária para a sobrevivência e o crescimento larval, a manutenção do alimento vivo por um longo período nos tanques de larvicultura em “água clara” (sem microalgas na água de cultivo) pode acarretar uma perda da qualidade nutricional destes alimentos com o passar do tempo.

Os efeitos benéficos associados ao fornecimento de microalgas na água de cultivo larval “água verde” têm sido atribuídos a uma variedade de fatores, incluindo: ingestão intencional e não intencional de células de algas (PALMER et al., 2007 ; REITAN et al., 1997), manutenção da qualidade nutricional de presas vivas (REITAN et al., 1997), alteração das condições ambientais como o regime de luz (NAAS et al., 1992), promoção da secreção de enzimas digestivas (CAHU e ZAMBONINO-INFANTE, 1998), aumento das propriedades antibacterianas (KOKOU, et al., 2012) e antioxidantes que controlam os genes de virulência (NATRAH et al., 2014).

Além da utilização dos enriquecedores comerciais, a utilização de microalgas durante a larvicultura, também melhorou a sobrevivência e o crescimento de larvas de peixes como o linguado (*Hippoglossus hippoglossus*) (NAAS et al., 1992), dourada (*Sparus aurata*) (PAPANDROULAKIS et al., 2002), pregado (*Scophthalmus maximus*) (OIE et al., 1997), bacalhau-do Atlântico (*Gadus morhua*) (VAN DER MEEREN et al., 2007), cavalo-marinho-do-focinho-longo (*Hippocampus reidi*) (MÉLO et al. 2016), assim como melhorou a taxa de sobrevivência de larvas de baixa qualidade do cavalo-marinho raiado (*Hippocampus erectus*) (LIU et al., 2023).

A presença das microalgas no tanque de cultivo larval também pode melhorar a capacidade visual das larvas na percepção das presas, preparar o sistema digestório para a primeira nutrição exógena, servindo como fonte direta de nutrientes, além de fornecer nutrientes essenciais como vitaminas e ácidos graxos para o alimento-vivo ofertado, o qual será consumido pelas larvas de peixes (LEE; OSTROWSKI 2001; HJELMELAND et al.,1998) fazendo com que as taxas de sobrevivência e de crescimento larval aumentem (NAAS et al.,1992; STUART; DRAWBRIDGE, 2011).

Embora alguns autores e protocolos de criação de cavalos-marinhos utilizarem microalgas na água de cultivo larval (GOMEZ-JURADO; GARDNER 2005; OLIVOTTO et al., 2008; WILLADINO et al., 2012; PHAM & LIN 2013; MÉLO et al., 2016; LIU et al., 2023), estudos que avaliem a influência das microalgas no sistema digestório de cavalos-marinhos ainda são escassos.

1. 2 OBJETIVOS

1.2.1 *Objetivo geral*

Aprimorar as técnicas de larvicultura do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* através da adição de microalgas na água de cultivo “água verde” visando maximizar a sobrevivência e o desempenho zootécnico.

1.2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar o efeito da técnica de “água verde” (microalgas *Tisochrysis lutea* e *Chaetoceros muelleri*) na sobrevivência, no crescimento e na composição lipídica do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* durante os primeiros 15 dias de vida.
- Verificar a influência das microalgas utilizadas durante a técnica “água verde” no aumento da área de absorção intestinal do cavalo marinho *Hippocampus reidi* durante os primeiros 15 dias de vida.

1. 3 ESTRUTURA DA TESE

A tese está dividida em dois capítulos. Cada capítulo corresponde a um artigo. Os artigos estão formatados de acordo com as normas da revista Aquaculture.

Uso da microalga *Tisochrysis lutea* em sistema de “água verde” aumenta o peso de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933

Uso da microalga *Tisochrysis lutea* em sistema de “água verde” aumenta a área de absorção no intestino de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933

2 ARTIGO 1.

Uso da microalga *Tisochrysis lutea* em sistema de “água verde” aumenta o peso de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933

The use of the microalgae *Tisochrysis lutea* in a “green water” system increases the weight of seahorse larvae *Hippocampus reidi*, Ginsburg, 1933

Elen Monique de Oliveira SOUSA ^a, Nayara Yoshimini de OLIVEIRA ^a, Ianka Agra da SILVA ^a, Renata Ávila OZÓRIO ^a, Madison Willy Silva CORDEIRO ^b, Roger WAGNER ^b, Mônica Yumi TSUZUKI ^a

^a Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) Departamento de Aquicultura, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

^b Laboratório de Análise de Alimentos, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, Brasil

Abstract: This study evaluated the effects of the addition of microalgae to the rearing water on the survival rate, performance and fatty acids profile of *H. reidi* larvae. Four treatments composed of two microalgae (*Tisochrysis lutea* - ISO and *Chaetoceros muelleri*-CHO), used alone (TISO and TCHO) or combined (TIC, 1:1), and a treatment without microalgae (TSM) were tested during the first 15 days of larviculture. Larvae were fed from the first to the seventh day with copepods (*Parvocalanus crassirostris*; 2 ind. mL⁻¹) and rotifers (*Brachionus rotundiformis*; 8 ind. mL⁻¹), and from the eighth day onwards with *Artemia* sp. nauplii (2 ind. mL⁻¹). No significant differences in survival rates were observed among the treatments (77.3 to 88.0%). The addition of *T. lutea* in the TISO and TIC treatments positively and significantly affected weight (~ 25.69 mg), weight gain (~11.41 mg), specific growth rate (~16.78% day⁻¹) and the condition factor (0.36) of larvae compared to TWM (20.91mg; 9.14 mg; 15.45% day⁻¹; 0.31, respectively) (P< 0.05). A higher concentration of polyunsaturated fatty acid (PUFA), docosahexaenoic acid (DHA), \sum n-3, n-3/n-6 ratio were found in TISO larvae after 15 days of rearing (P<0.05). In conclusion, the addition of microalgae, specifically *Tisochrysis lutea*, in the rearing water during the first 15 days of life of the seahorse *H. reidi* proved to be an advantageous alternative intensive system production system, since its inclusion positively affected the performance and the lipid composition of the larvae compared to the treatment without the addition of microalgae (TWM).

Key words: Larviculture, Microalgae, *Hippocampus reidi*, Lipid composition

Resumo: Este estudo avaliou os efeitos da adição de microalgas à água de criação sobre a taxa de sobrevivência, desempenho e perfil de ácidos graxos de larvas de *H. reidi*. Quatro tratamentos compostos por duas microalgas (*Tisochrysis lutea* - ISO e *Chaetoceros muelleri*-CHO), utilizadas isoladamente (TISO e TCHO) ou combinadas (TIC, 1:1), e um tratamento sem microalgas (TWM) foram testados durante os primeiros 15 dias de larvicultura. As larvas foram alimentadas do primeiro ao sétimo dia com copépodes (*Parvocalanus crassirostris*; 2 ind. mL⁻¹) e rotíferos (*Brachionus rotundiformis*; 8 ind. mL⁻¹), e a partir do oitavo dia com náuplios de *Artemia* sp. (2 ind. mL⁻¹). Não foram observadas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência entre os tratamentos (77,3 a 88,0%). A adição de *T. lutea* nos tratamentos TISO

e TIC afetou positiva e significativamente o peso (~25,69 mg), o ganho de peso (~11,41 mg), a taxa de crescimento específico (~16,78% dia⁻¹) e o fator de condição (0,36) de larvas em comparação com TWM (20,91 mg; 9,14 mg; 15,45% dia⁻¹; 0,31, respectivamente) (P<0,05). Uma maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), ácido docosahexaenóico (DHA), proporção \sum n-3, n-3/n-6 foi encontrada em larvas de TISO após 15 dias de criação (P<0,05). Conclui-se que a adição de microalgas, especificamente *Tisochrysis lutea*, na água de criação durante os primeiros 15 dias de vida do cavalo-marinho *H. reidi* mostrou-se uma alternativa vantajosa ao sistema intensivo de produção, uma vez que sua inclusão afetou positivamente o desempenho e a composição lipídica das larvas em comparação ao tratamento sem adição de microalgas (TWM).

Palavras-chave: Larvicultura, Microalgas, *Hippocampus reidi*, Composição lipídica

2. 1 INTRODUÇÃO

Cavalos-marinhos são peixes teleósteos do gênero *Hippocampus*, família Syngnathidae, geralmente encontrados em águas rasas de regiões tropicais e temperadas (Lourie et al., 2004). Devido à perda de habitat, e a elevada pressão da coleta no ambiente natural, todas as espécies de cavalos-marinhos encontram-se na lista vermelha de espécies ameaçadas da International Union for Conservation of Nature – IUCN (IUCN, 2019). No litoral do Brasil, ocorrem três espécies de cavalos-marinhos: *Hippocampus erectus*, *H. patagonicus* e o *H. reidi* (Silveira et al., 2014), sendo todas consideradas vulneráveis pela lista de espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção (Portaria MMA nº 148/2022).

Apesar de haver uma preferência do mercado por cavalos-marinhos vivos produzidos pela aquicultura, pela maior adaptação ao consumo de alimentos inertes e às condições de cativeiro, as exigências nutricionais e os padrões de alimentação adequados, que influenciam diretamente a sobrevivência e o desempenho das larvas, ainda são lacunas importantes para o cultivo em grande escala. Em trabalhos realizados com *H. reidi*, observou-se que, assim como em outras espécies de cavalos-marinhos, este apresenta trato digestório sem um estômago diferenciado (Novelli et al., 2015) e baixa atividade de enzimas digestivas (Souza et al., 2020), o que dificulta a digestão do alimento, especialmente em recém-nascidos. Desta forma, um dos principais fatores que afeta positivamente a sobrevivência larval é a alimentação adequada, que está relacionada com a ingestão, digestão e assimilação dos nutrientes essenciais necessários do alimento oferecido (Lazo et al., 2007, Olivotto et al., 2011).

Normalmente, nas fases iniciais de cultivo de cavalos-marinhos são utilizados como principais itens alimentares os rotíferos (*Brachionus* sp.) e a artêmia (*Artemia* sp.) (Foster e Vincent, 2004; Olivotto et al., 2008; Koldewey e Martin-Smith, 2010; Olivotto et al., 2011). No entanto, estes alimentos apresentam níveis naturalmente baixos de ácidos graxos essenciais altamente insaturados (HUFAs), como o ácido eicosapentaenóico (EPA; 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6n-3), sendo necessário enriquecê-los com microalgas vivas ou secas, concentrado de óleo de peixe auto emulsificado ou enriquecedores comerciais para aumentar o seu valor nutricional (Payne e Ripplingale 2000; Sorgeloos et al., 2001; Palma et al., 2011; Figueiredo et al., 2012).

Alguns trabalhos já demonstraram que a utilização de enriquecedores no alimento-vivo proporciona uma boa sobrevivência e crescimento de *H. abdominalis* (Woods, 2005; Martinez-Cardenas e Purser, 2007) e *H. guttulatus* (Palma et al., 2011). Apesar do enriquecimento do alimento vivo suprir à quantidade de ácidos graxos altamente insaturados necessários para a

sobrevivência e o crescimento larval, a manutenção deste alimento por um longo período nos tanques de larvicultura em água clara (sem microalgas na água de cultivo) pode acarretar uma perda gradual da qualidade nutricional destes alimentos (Wang et al., 2019). Além do enriquecimento, o conteúdo nutricional do alimento vivo pode ser alterado pela adição de microalgas à água de cultivo (Neori, 2011).

A presença das microalgas pode melhorar a capacidade visual das larvas na percepção das presas na água de cultivo, preparar o sistema digestivo larval para a primeira nutrição exógena e também trazer benefícios nutricionais diretos, servindo como fonte direta de nutrientes, além de fornecer nutrientes essenciais como vitaminas e ácidos graxos para o alimento vivo ofertado, o qual será consumido pelas larvas de peixes (Hjelmeland et al., 1998; Lee e Ostrowski, 2001), resultando na melhora das taxas de sobrevivência e de crescimento larval (Naas et al., 1992; Palmer et al., 2007; Stuart e Drawbridge, 2011).

Algumas espécies de microalgas sintetizam naturalmente os principais ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (por exemplo, ácido eicosapentaenóico-EPA e docosahexaenóico ácido-DHA), que são cruciais para as necessidades energéticas e de crescimento de espécies cultivadas (Shah et al., 2018). Nesse sentido, as microalgas apresentam diferenças no seu perfil de ácido graxos: a *Tisochrysis lutea* possui níveis mais altos de DHA, enquanto a *Chaetoceros mulleri* tem níveis mais elevados de EPA (Martínez-Fernández et al., 2006) e, devido a seus perfis nutricionais complementares, seu uso combinado pode resultar em uma melhor produção de larvas (Rico-Villa et al., 2006; Galley et al., 2010).

Dessa forma, é possível observar que na larvicultura de peixes marinhos, em especial de cavalos-marinhos, a “água verde” pode ser uma alternativa viável e vantajosa em um sistema de produção intensivo, visto que a presença das algas no sistema pode acarretar em uma melhora no enriquecimento do alimento ofertado, além de atenuar a intensidade da luz, o que facilita a captura do alimento, além dos inúmeros outros benefícios que esta técnica apresenta. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do enriquecimento da água de cultivo com microalgas na taxa de sobrevivência, desempenho e perfil de ácidos graxos de larvas de *H. reidi*.

2. 2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local de estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), localizado na Estação de Maricultura Elpídio Beltrame (Florianópolis, SC, Brasil). Os

procedimentos realizados durante o experimento estavam de acordo com protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, (CEUA-UFSC / 5542220321).

2.2.2 Origem e aclimação dos reprodutores

Reprodutores (n= 24) de *H. reidi* Ginsburg, 1933 foram coletados na Baía do Espírito Santo (Vitória- ES, Brasil, 20°19' S, 40°20' W), com autorização ICMBio SISBIO n°76002-1. Durante os 35 dias de quarentena, os animais foram mantidos em aquários de 140 L conectados a um sistema de recirculação de água salgada, equipado com filtro mecânico (bag), “skimmer”, filtros biológicos e ultravioleta. O fotoperíodo diário utilizado foi de 12 horas de luz.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com camarões carídeos *Palaemon* sp. (Weber, 1795), coletados numa lagoa nas proximidades do Laboratório de Ictiologia e Ictioplâncton (ICTOLAB- ES). Após a captura, o camarão morto e inteiro (comprimento total de $22,89 \pm 2,02$ mm- média \pm desvio padrão; e peso total $103,58 \pm 33,38$ mg) foi lavado em água doce e congelado. Antes do seu uso como alimento para reprodutores de cavalos-marinhos, este era enriquecido com uma mistura de óleo de fígado de bacalhau (ácidos graxos totais Ômega-3: 24%, DHA: 12%, EPA 8%; Mollers Tran, Noruega) e espirulina seca (proteína: 63,5%, carboidrato: 16,1%, lipídios: 0,8%; Alga Bloom microalgas, Brasil) na proporção de 1:3, injetada ($65 \pm 0,02$ mg) em cada camarão com auxílio de seringas de 5 mL (adaptação da metodologia utilizada no ICTOLAB).

2.2.3 Cultivo de alimento vivo

Os rotíferos *Brachionus rotundiformis*, provenientes do Laboratório de Peixes Marinhos (LAPMAR) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foram mantidos em tanques de 50 L a 26 ± 2 °C de temperatura e 25 de salinidade, alimentados com microalga *Nannochloropsis oculata* de acordo com a densidade de rotíferos. Antes de serem fornecidos para as larvas de cavalo-marinho, os rotíferos foram enriquecidos com Red Pepper (Bern Aqua NV, Bélgica), produto de enriquecimento suplementar para rotíferos e artêmia, por 6 horas de acordo com a recomendação do fabricante, sendo lavados e filtrados em uma malha de 60 μ m, antes de serem ofertadas as larvas.

Os copépodes *Parvocalanus crassirostris* foram mantidos no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), cultivados em recipientes de 200 L e alimentados com as microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Tisochrysis lutea* de acordo com a densidade de copépodes (Kline; Laidley, 2015). Para concentrar os

copépodes utilizou-se uma malha de 45 μm , e após a filtração uma mistura de náuplios, copepoditos e adultos foram lavados e fornecidos às larvas.

Os cistos de artêmia (Porto Cyst, Natal, Brasil) foram colocados para eclosão a partir do 7º dia de experimento, em recipiente aerado e iluminado, mantidos em uma salinidade de 35 e temperatura de 28 °C. Após 24 h, os náuplios foram separados dos cistos, lavados e ofertados às larvas de cavalo marinho.

Com o intuito de avaliar o perfil de ácidos graxos dos alimentos vivos utilizados, amostras dos mesmos foram retiradas, congeladas e mantidas a -80 °C para posterior análise (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de ácidos graxos dos copépodes (*Parvocalanus crassirostris*), dos rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) enriquecidos e dos náuplios de artêmia utilizados como alimento vivo durante os 15 dias de larvicultura de *Hippocampus reidi*.

Ácido graxo (mg/g)	Copépode	Rotífero	Artêmia
10:0	3,66±0,37	6,86±2,88	0,19±0,12
11:0	0,25±0,12	0,51±0,09	0,07±0,01
12:0	0,18±0,01	*	0,04±0,01
13:0	1,27±1,35	1,25±0,72	0,10±0,01
14:0	7,98±1,86	3,66±3,61	1,70±0,10
15:0	2,37±0,33	3,13±0,59	0,77±0,03
16:0	25,88±0,65	17,25±3,40	21,74±0,83
16:1	13,50±4,60	1,94±4,21	13,79±0,19
17:0	0,66±0,04	*	2,50±0,10
17:1	0,14±0,04	*	3,11±0,09
18:0	21,44±3,42	*	12,23±0,05
18:1n-9 trans	*	0,83±0,52	0,36±0,05
18:1n-9	2,40±0,45	27,28±6,17	19,82±0,98
18:2n-6	1,17±0,09	7,14±1,24	7,64±0,31
18:3n-6	0,28±0,04	*	0,58±0,02
18:3n-3	0,50±0,23	*	2,28±0,11
20:0	0,27±0,09	*	0,36±0,02
20:1n-9	*	1,19±0,28	0,29±0,03
20:2n-6	0,83±0,12	0,46±0,17	0,37±0,03
20:4n-6 (AA)	2,08±0,06	0,73±0,12	5,27±0,29
20:5n-3 (EPA)	2,38±0,42	2,55±0,12	5,61±0,25
22:0	0,55±0,46	*	0,18±0,04
22:2n-6	0,22±0,17	0,54±0,23	0,12±0,01
22:5n-3	0,65±0,59	1,02±2,51	0,06±0,01
22:6n-3 (DHA)	17,44±0,35	15,31±1,48	0,15±0,09
∑ SFA	64,48±3,78	35,45±4,30	39,99±1,57
∑ MUFAS	16,04±3,54	32,46±3,16	37,50±0,73
∑ PUFAS	23,03±0,21	19,33±1,41	22,33±0,80
∑ n-3	18,47±0,26	21,16±2,71	8,98±0,40
∑ n-6	4,22±2,65	8,32±2,24	14,17±0,53
DHA/EPA	6,41±1,34	1,83±0,13	0,03±0,02
EPA/AA	1,15 ±0,24	3,49±0,41	1,06±0,01
n-3/n-6	4,07±0,48	2,09±0,75	0,62±0,01

SFA- ácidos graxos saturados; MUFA- ácidos graxos monoinsaturados; PUFA- ácidos graxos poli-insaturados; DHA- ácido docosahexaenóico; EPA- ácido eicosapentaenóico, AA- ácido araquidônico.

Dados apresentados como média ± desvio padrão

* valores não detectados

2.2.4 Cultivo de microalgas

Microalgas *C. muelleri* (CCMP 1316) e *T. lutea* (CCMP 1324), provenientes do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), foram cultivadas para serem fornecidas ao alimento-vivo durante todo o período experimental, sendo repicadas semanalmente a fim de manter os cultivos sempre em fase exponencial de crescimento. A biomassa foi produzida no Laboratório de Cultivo Algas (LCA), UFSC, em frascos de 2 L contendo o meio LCA-AM (Sales et al., 2020). As culturas foram mantidas em sala com temperatura controlada de 22 °C, com agitação constante através da injeção de ar comprimido enriquecido com 0,5% de CO₂ (v/v).

Com o intuito de se avaliar o perfil de ácidos graxos das culturas de *C. muelleri* e *T. lutea*, as biomassas em fase exponencial de crescimento foram separadas por centrifugação (10 min., 3500 rpm), congeladas e mantidas a -80 °C para posterior análise. (**Tabela 2**).

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Tisochrysis lutea* e *Chaetoceros muelleri*.

Ácido graxo (mg/g)	<i>Tisochrysis lutea</i>	<i>Chaetoceros muelleri</i>
10:0	0,53±1,57	0,19±0,29
11:0	0,18±0,07	0,11±0,06
12:0	0,06±0,02	0,14±0,27
13:0	0,09±0,27	0,12±0,37
14:0	14,25±1,51	10,88±2,24
14:1	0,20±0,34	0,11±0,00
15:0	0,84±0,79	0,96±0,08
16:0	19,94±2,50	17,25±5,88
16:1	32,02±14,84	4,97±5,09
17:0	1,24±0,05	1,69±0,65
18:0	9,97±3,27	3,71±9,52
18:1n-9	0,13±0,07	0,18±0,36
18:1n-9 cis	4,22±9,20	25,72±9,72
18:2n-6 cis	5,58±2,66	4,10±1,75
18:3n-3	0,93±1,56	3,64±1,56
18:3n-6	0,31±0,09	0,18±0,03
20:0	0,16±0,04	0,14±0,10
20:2n-6	0,13±0,08	9,31±3,24
20:3n-6	0,16±0,04	0,02±0,05
20:3n-3	0,08±0,04	0,06±0,12
20:4n-6 (AA)	3,57±2,36	0,20±0,57
20:5n-3 (EPA)	4,96±0,22	0,81±0,73
22:0	0,26±0,09	0,40±0,22
22:2	0,08±0,01	0,18±0,44
22:5n-3	0,05±0,10	0,02±0,00
22:6n-3 (DHA)	8,23± 0,71	0,39±0,08
∑ SFA	47,59±5,45	39,96±4,06
∑ MUFAS	35,63±6,09	29,89±5,35
∑ PUFAS	23,25±0,09	19,98±1,05
∑ n-3	14,17±0,52	5,13±1,03
∑ n-6	9,80±2,50	15,11±0,53
DHA/EPA	1,59±0,12	0,48±0,27
EPA/AA	1,39±0,21	3,05±1,43
n3-/n-6	1,84±0,66	0,32±0,06

SFA- ácidos graxos saturados; MUFA- ácidos graxos monoinsaturados; PUFA- ácidos graxos poli-insaturados; DHA- ácido docosahexaenóico; EPA- ácido eicosapentaenóico, AA- ácido araquidônico.

Dados apresentados como média ± desvio padrão

2.2.5 Delineamento e Procedimento Experimental

Após o nascimento, 30 larvas de cavalo-marinho foram distribuídas aleatoriamente e mantidas em cada um dos 12 tanques circulares de PVC com volume total de 3 L, na densidade

de (10 larvas /L). O experimento teve duração de 15 dias e foi realizado em um sistema de recirculação de água, equipado com “skimmer”, filtro biológico de mídias de cerâmica e bag filtrante de 100 µm. A troca de água permaneceu desligada durante o dia e ligada durante a noite para a retirada de microalgas e alimento vivo residuais. As unidades amostrais utilizadas neste trabalho e o sistema de manutenção para a larvicultura foram confeccionados de acordo com a metodologia adaptada de Moorhead (2015).

Foram testados quatro tratamentos em triplicata: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri* na proporção de 1:1.

Diariamente, antes da primeira alimentação, as microalgas eram adicionadas às unidades experimentais a uma concentração de 200.000 cel mL⁻¹ de cada espécie (Kline; Laidley, 2015), sendo estimada por contagem em microscópio com o auxílio da câmara de Neubauer. As larvas de *H. reidi* foram alimentados três vezes ao dia (09:00, 13:00 e 17:00), do 1º ao 7º dia com rotíferos *Brachionus rotundiformis* (8 ind. mL⁻¹) e com copépodes *Parvocalanus crassirostris* (2 ind. mL⁻¹), e a partir do 8º dia foi ofertado de forma gradual náuplios de artêmia (2 ind. mL⁻¹). Antes da alimentação, a contagem residual do alimento vivo era realizada para a reposição e a manutenção da densidade adequada.

O fotoperíodo utilizado foi de 14 horas luz (lâmpadas fluorescentes de 15 W). Os parâmetros físicos e químicos da água foram avaliados diariamente antes da primeira alimentação. A temperatura e o oxigênio foram mensurados com oxímetro (MO-920-Instrutherm) e mantiveram-se em torno de 27,80 ± 0,05 °C, 6,3 ± 0,07 mg L⁻¹, respectivamente, a salinidade manteve-se em 30 ± 0,09, verificada com refratômetro óptico (Soma SHR-10 ATC) e o pH manteve-se em 8,03 ± 0,01, aferido através do pHmetro de bancada (AZ-86505).

2.2.6 Análise de ácidos graxos

Ao final do experimento as amostras (larvas de cavalo-marinho, alimentos e microalgas) foram congeladas e mantidas a -80 °C até o momento da análise. As amostras de larvas de cavalo-marinho foram compostas de 6 a 8 indivíduos (~80 mg) por repetição, para a avaliação das dietas de microalgas marinhas e alimentos vivos foi utilizado 60 mg de biomassa de peso úmido. As biomassas foram acondicionadas em tubos de vidro (13×100 mm) e adicionadas 1 mL de clorofórmio e pérolas de vidro (n = 5; 3 mm de diâmetro), onde foram mantidas em repouso durante 10 min. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente com

auxílio de vortex orbital por 1 min e os lipídios então foram extraídos à frio de acordo com Bligh e Dyer (1959), com modificações descritas por Vendruscolo et al. (2022). Assim, a essa solução foram adicionados 2 mL de metanol e 0,7 mL de água destilada e as amostras ficaram em agitação por 30 min. Posteriormente, a partição dos lipídeos ocorreu pela adição de 1 mL de clorofórmio e 1 mL de solução de sulfato de sódio 1,5%. 1,5 mL da solução orgânica foi transferida para outro tubo de vidro, onde os lipídeos foram obtidos pela evaporação do clorofórmio em sistema de vácuo a 40 °C. A fração lipídica foi submetida a transesterificação alcalina, a qual foi adaptada do método ISO 5509 descrito pela *International Organization for Standardization* (ISO, 1978). Assim, aos lipídeos foram adicionados 0,2 mL de solução 2 M KOH em metanol e 1 mL de hexano. Após agitação em vórtex (1 min) foi reservado a fração orgânica contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) para análise cromatográfica.

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo à gás equipado com detector de ionização em chamas (GC-FID; Varian, modelo Star CX 3400, USA) e autosampler (Varian 8200). 1 µL das soluções metiladas foram introduzidas no injetor, que operou no modo splitless (split-valve off por 0,8 min) a temperatura constante de 250 °C. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a pressão constante de 25 psi. Os FAMES foram separados em uma coluna capilar SPTM-2560 (100 m × 0,25 mm d.i.; 0,20 µm de espessura de fase estacionária; Bellefonte, USA). A temperatura da coluna iniciou em 80 °C, permanecendo por 2 min, após aumentou a uma taxa de 8 °C min⁻¹ até 200 °C; depois até 210 °C subindo a uma taxa de 1 °C min⁻¹ e, por fim, aumentou até 240 °C com uma rampa de 2 °C min⁻¹, mantendo-se por 3 min. O FID foi mantido sob temperatura constante de 250 °C. A identificação dos FAMES se deu pela comparação dos picos da amostra com aqueles obtidos da mistura de padrões FAME Mix-37 (P/N 47885-U; Sigma Aldrich, USA) Docosapentaenoic methyl ester (DHA; P/N 47563-U; Sigma Aldrich, USA), a qual foi analisada nas mesmas condições. A técnica de normalização das áreas dos picos cromatográficos foi utilizada para a quantificação dos ácidos graxos, os quais tiveram corrigidos suas áreas pelos fatores de correção do tamanho equivalente de cadeia dos ácidos graxos e fator de conversão de éster em ácido, conforme Visentainer (2012).

2.6. Desempenho zootécnico

O crescimento das larvas de cavalo-marinho, em comprimento total (mm) e em peso úmido (mg) foi estimado através da média de 30 indivíduos no dia do nascimento e da média de 15 indivíduos por tratamento no final do experimento (15º dia), sendo as larvas eutanasiadas com óleo de cravo (1,5 mL L⁻¹) antes da biometria. O comprimento total (em mm) foi definida

como o somatório da altura da coroa, do tronco até comprimento da cauda (Lourie et al., 2004), as medidas foram realizadas através do software Dino Capture, a partir de uma câmera USB Dino-Eye acoplada a uma lupa estereoscópica binocular na medição das larvas. O peso (úmido) dos indivíduos foi aferido com uma balança analítica de precisão (0,001 g).

Com a utilização desses dados biométricos, foram calculadas:

Taxa de crescimento específico (TCE) em peso (%.dia⁻¹): $TCE = 100x [\ln (\text{peso final}) - \ln (\text{peso inicial em mg}) / \text{tempo}]$, onde ln= log natural

Taxa de desenvolvimento específico (TDE) (%.dia⁻¹): $TDE = 100x [\ln (\text{altura Final em mm}) - \ln (\text{altura inicial em mm}) / \text{tempo em dia}]$;

Fator de condição de Fulton (FC): $(\text{Peso em mg} / \text{Altura}^3 \text{ em mm}) \times 100$;

Ganho de peso (GP) (mg): $(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial}$;

Sobrevivência (%): $100x (\text{número de sobreviventes no dia}) / (\text{número de peixes inicial} - \text{número de peixes retirados para amostragem no dia})$.

2.2.7

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade e distribuição dos dados. Como os dados apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância (ANOVA - One Way) para determinação de possíveis diferenças entre as variáveis. Os dados em percentual foram transformados utilizando a função arco-seno antes de serem analisados e o teste de Tukey ao nível de 5,0% de significância também foi aplicado com a utilização do software Sigma Plot.14. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

2.3 RESULTADOS

2.3.1. Sobrevivência e desempenho zootécnico

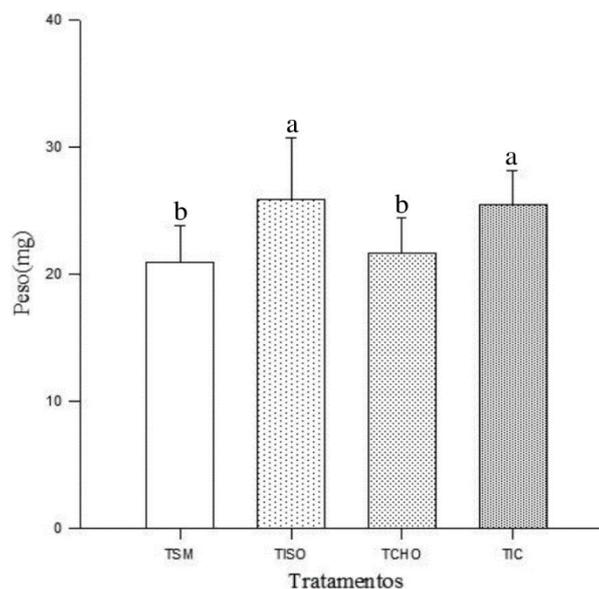
Em relação à sobrevivência, as taxas não diferiram significativamente entre os diferentes tratamentos com e sem a adição de microalgas ($P > 0,05$) (Tabela 3), variando de 77,3 (TCHO) a 88% (TIC) aos 15 dias de larvicultura.

Tabela 3. Sobrevivência (média \pm DP) de larvas de *Hippocampus reidi* com 15 dias submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*.

Tratamentos	Sobrevivência (%)
TSM	84,00 \pm 4,00
TISO	84,00 \pm 2,30
TCHO	77,30 \pm 3,50
TIC	88,00 \pm 4,00

As larvas de cavalo-marinho nasceram com peso de $2,01 \pm 0,21$ mg e $6,68 \pm 0,55$ mm de comprimento total. Após 15 dias de cultivo, valores maiores e similares de peso foram obtidos nos tratamentos com a microalga *Tisochrysis lutea* (TISO) ($25,91 \pm 4,07$ mg) e o combinado das duas microalgas (*Tisochrysis lutea* e *Chaetoceros muelleri*) (TIC) ($25,47 \pm 2,64$ mg) se comparados com valores do tratamento sem a adição de microalga (TSM) ($20,91 \pm 2,93$ mg) e do tratamento com a microalga *Chaetoceros muelleri* (TCHO) ($21,68 \pm 2,75$ mg) ($P < 0,05$), que não diferiram entre si (Figura 1).

Figura 1. Peso (mg) (média \pm DP) de larvas de *Hippocampus reidi* com 15 dias submetidos a diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea*+ *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).



Em relação ao comprimento total das larvas, ao final do experimento, nenhum dos tratamentos com a adição de microalgas induziu alterações significativas neste parâmetro, da mesma forma, não houve diferenças significativas na taxa de desenvolvimento específico (TDE), (Tabela 4).

Valores da taxa de crescimento específico (TCE; % dia⁻¹) e do ganho de peso das larvas após 15 dias de cultivo nos tratamentos TISO e TIC foram maiores e significativamente diferentes quando comparados ao TSM (P<0,05), mas não diferiram em relação ao TCHO (Tabela 4). Em relação ao Fator de Condição, as larvas mostraram valores significativamente maiores e similares nos tratamentos com adição de microalga em relação ao tratamento sem adição da microalga (TSM) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros zootécnicos de larvas de *Hippocampus reidi* com 15 dias submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC - adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*.

	TSM	TISO	TCHO	TIC
CT¹	18,72±0,67 ^a	19,24±1,00 ^a	18,72±0,74 ^a	19,16±0,78 ^a
TCE²	15,45±0,60 ^a	16,72±0,14 ^b	15,95±0,23 ^{ab}	16,84±0,46 ^b
TDE³	6,98±0,27 ^a	7,13±0,44 ^a	6,88±0,17 ^a	7,09±0,54 ^a
GP⁴	9,14±0,91 ^a	11,29±0,26 ^b	9,95±0,39 ^{ab}	11,53±0,86 ^b
FC⁵	0,31±0,01 ^a	0,36±0,01 ^b	0,33±0,02 ^b	0,36±0,03 ^b

1= Comprimento Total; 2= Taxa de Crescimento Específico; 3= Taxa de Desenvolvimento Específico; 4 = Ganho de Peso (mg); 5= Fator de Condição. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos (P < 0,05).

Dados apresentados como média ± desvio padrão

2.3.2. Perfil de ácido graxos das larvas de *Hippocampus reidi* após 15 dias

O perfil de ácidos graxos saturados (SFA) foi significativamente maior nas larvas do TCHO do que nos demais tratamentos após 15 dias de larvicultura (P<0,05). Já valores de (MUFAS) foram significativamente maiores nas larvas do tratamento TIC em relação aos demais tratamentos (P<0,05) e os (PUFA) foram significativamente maiores nas larvas do TISO do que nos demais tratamentos. As larvas do TISO apresentaram níveis de n-3 significativamente maiores do que os demais tratamentos. Valores de AA e de EPA, assim como a razão DHA/EPA e de EPA/AA não diferiram entre as larvas nos diferentes tratamentos. No entanto, valores mais elevados e significativos de DHA, \sum n-3, razão n-3/n-6 foram encontrados nas larvas do TISO após os 15 dias de cultivo (P<0,05) (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos das larvas de *Hippocampus reidi* após 15 dias de cultivo nos tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO - adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO - adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC - adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*.

Ácido graxo (mg/g)	TSM	TISO	TCHO	TIC
8:0	1,25±0,11 ^b	2,80±0,45 ^a	3,02±0,59 ^a	0,74±0,05 ^b
10:0	0,07±0,00 ^b	0,18±0,03 ^a	0,12±0,04 ^{ab}	0,05±0,02 ^b
13:0	0,21±0,02 ^c	0,35±0,01 ^a	0,28±0,06 ^{ac}	0,10±0,01 ^b
14:0	1,40±0,15 ^a	1,70±0,06 ^a	1,18±0,16 ^a	1,55±0,41 ^a
15:0	1,27±0,08 ^c	1,88±0,28 ^a	1,62±0,19 ^{ac}	0,73±0,08 ^b
16:0	21,82±0,62 ^a	21,85±0,79 ^a	23,39±0,51 ^a	19,32±0,99 ^b
16:1	4,50±0,08 ^a	4,91±0,09 ^a	4,78±0,20 ^a	5,62±0,93 ^a
17:0	1,94±0,05 ^a	1,88±0,12 ^a	2,03±0,30 ^a	1,98±0,34 ^a
17:1	1,24±0,13 ^a	1,14±0,01 ^a	1,08±0,07 ^a	1,15±0,23 ^a
18:0	21,33±0,73 ^b	20,51±0,37 ^b	22,68±0,00 ^a	17,81±0,21 ^c
18:1 trans isomer	0,51±0,07 ^a	0,44±0,01 ^a	0,48±0,01 ^a	0,22±0,02 ^b
18:1n-9	14,48±0,08 ^{bc}	15,13±0,12 ^c	13,68±0,58 ^b	20,64±0,26 ^a
18:2n-6	5,17±0,15 ^a	5,05±0,10 ^a	4,53±0,29 ^a	5,65±0,77 ^a
18:3n-3	0,53±0,24 ^a	0,64±0,13 ^a	0,55±0,12 ^a	0,81±0,19 ^a
18:3n-6	0,18±0,01 ^a	0,24±0,03 ^a	0,20±0,05 ^a	0,25±0,05 ^a
20:0	0,22±0,00 ^b	0,22±0,02 ^b	0,25±0,01 ^b	0,45±0,04 ^a
20:1n-9	0,30±0,00 ^a	0,28±0,02 ^a	0,28±0,01 ^a	0,28±0,02 ^a
20:2n-6	0,13±0,00 ^b	0,20±0,00 ^a	0,17±0,01 ^c	0,20±0,00 ^a
20:3n-6	0,14±0,00 ^a	0,12±0,02 ^a	0,10±0,03 ^a	0,12±0,03 ^a
20:3n-3	0,06±0,00 ^b	0,09±0,01 ^a	0,05±0,02 ^b	0,06±0,00 ^b
20:4n-6 (AA)	9,29±0,42 ^a	9,19±0,15 ^a	8,76±0,07 ^a	9,03±0,99 ^a
20:5n-3 (EPA)	3,33±0,11 ^a	3,24±0,15 ^a	3,19±0,31 ^a	3,33±0,11 ^a
22:0	0,41±0,03 ^a	0,24±0,00 ^b	0,33±0,01 ^a	0,40±0,06 ^a
22:5n-3 (DPA)	0,56±0,01 ^a	0,53±0,01 ^{ab}	0,46±0,03 ^b	0,56±0,06 ^a
22:6n-3 (DHA)	4,98±0,27 ^b	7,04±1,63 ^a	4,85±0,79 ^b	4,59±0,37 ^b
∑ SFA	49,96±0,95 ^b	51,62±0,51 ^b	54,92±0,95 ^a	45,55±1,27 ^c
∑ MUFA	21,04±0,22 ^b	21,90±0,24 ^b	20,30±0,86 ^b	27,43±0,07 ^a
∑ PUFA	24,39±0,35 ^c	26,36±0,01 ^a	22,84±0,09 ^b	24,86±0,79 ^c
∑ n-3	9,465±0,06 ^b	11,01±0,83 ^a	9,105±0,30 ^b	9,505±0,44 ^b
∑ n-6	14,93±0,29 ^a	14,80±0,30 ^{ab}	13,73±0,39 ^b	14,68±0,67 ^{ab}
DHA/EPA	1,50±0,13 ^a	2,15±0,40 ^a	1,54±0,40 ^a	1,36±0,26 ^a
EPA/AA	0,35±0,00 ^a	0,35±0,01 ^a	0,36±0,03 ^a	0,38±0,03 ^a
n-3/n-6	0,62±0,07 ^b	0,73±0,07 ^a	0,66±0,01 ^c	0,61±0,04 ^b

SFA- ácidos graxos saturados; MUFA- ácidos graxos monoinsaturados; PUFA- ácidos graxos poli-insaturados; DHA- ácido docosahexaenoico; EPA- ácido eicosapentaenoico, AA- ácido araquidônico. Dados apresentados como média ± desvio padrão

2. 4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a adição das microalgas, especificamente de *Tisochrysis lutea* (TISO e TIC), na água de cultivo afetou positivamente o peso, o ganho de peso, a taxa de crescimento específico e o fator de condição das larvas, sobretudo em relação ao tratamento sem adição da microalga (TSM). Estes resultados possivelmente refletem a importância da microalga *T. lutea*, devido ao seu perfil nutricional, especialmente pelos elevados níveis de DHA que apresenta (Martínez-Fernández et al., 2006). O DHA e EPA apresentam um papel importante durante o desenvolvimento larval de peixes na manutenção da fluidez da membrana, o DHA quando incorporado ao tecido nervoso, e quando fornecido em quantidades adequadas promove o desenvolvimento e maturação do sistema digestivo, crescimento, sobrevivência e morfogênese normal (Zambonino e Cahu, 1999; Sargent et al., 2002; Cahu et al., 2003; Villeneuve et al., 2005; Tocher, 2010), enquanto sua deficiência pode induzir a estresse fisiológico (Lund et al., 2012). Mélo et al. (2016), durante a larvicultura de *H. reidi*, verificaram que a adição da microalga *N. oculata* no cultivo de *H. reidi* alimentados com o copépode *Tisbe biminiensis*, náuplios e metanáuplios de artêmia aumentou significativamente o crescimento, a altura, o peso seco e a sobrevivência larval (aprox. 75% no tratamento com a microalga comparado a 25% de sobrevivência no tratamento sem a adição de microalgas).

Após os 15 de cultivo, as larvas do tratamento TISO mostraram valores mais elevados de DHA, da $\sum n-3$ e da razão $n-3/n-6$. Estudos com larvas de peixes marinhos mostraram que estes apresentam exigências maiores de $n-3$ do que $n-6$, assim como é necessário mais DHA do que EPA como ácido graxo essencial (Izquierdo et al., 1989; Mourente et al., 1993; Watanabe et al., 1989; Faleiro e Narciso, 2010; Izquierdo e Koven 2011). As exigências nutricionais dos cavalos-marinhos ainda são desconhecidas, mas uma fração de ácidos graxos bem balanceada de AA, EPA e DHA, apresenta um papel fundamental na nutrição dos cavalos-marinhos refletindo na sobrevivência e no crescimento (Faleiro & Narciso, 2010; Planas et al., 2020). Na larvicultura do bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*), o uso da microalga *I. galbana* na água de cultivo melhorou a sobrevivência, além de mostrar na composição lipídica larval uma maior porcentagem de DHA, indicando a importância dos benefícios nutricionais indiretos que as algas podem proporcionar às larvas (Van der Meer et al., 2007).

Em geral, as larvas de peixes possuem uma necessidade ou uma exigência absoluta de fosfolípidios na dieta durante o desenvolvimento inicial, devido principalmente a falta de um

trato digestivo (Bell et al., 2003) sendo que, os cavalos-marinhos pertencem ao grupo dos peixes agástricos, definidos por não possuírem estômago (Wilson & Castro, 2010). A importância do DHA para o aumento do crescimento e da sobrevivência de várias larvas de peixes marinhos já vem sendo estudada (Izquierdo 2005; Izquierdo e Koven, 2011) assim como em larvas de cavalo-marinho (Filleul, 1996; Chang e Southgate, 2001; Planas et al., 2020). Um suprimento insuficiente de DHA durante a larvicultura mostrou causar malformações, crescimento mais lento e aumento da mortalidade em peixes (Tocher, 2010; Lund et al., 2014).

Além da maior quantidade de DHA que a *T. lutea* apresenta e seu benefício comprovado neste estudo quando empregada na larvicultura do *H. reidi* em “água verde”, a utilização de uma diversidade de itens alimentares, assim como a inclusão do copépode *P. crassirostris*, como item alimentar nesta fase de cultivo do *H. reidi*, possivelmente contribuiu para os resultados positivos de crescimento encontrados. Diversos estudos também têm demonstrado que a suplementação de copépodes como alimento vivo em cavalos-marinhos maximizam significativamente as taxas de sobrevivência e de crescimento do que quando alimentados apenas com rotíferos ou artêmia (ou a combinação de ambos) (Payne e Rippingale, 2000; Hora e Joyeux, 2009; Olivotto et al., 2010; Willadino et al., 2012; Palma et al., 2014; Zhang et al., 2015; Blanco e Planas, 2016).

A porcentagem de sobrevivência das larvas com 15 dias pós-parição de *H. reidi* no presente estudo, foi bastante elevada para a espécie nesta idade, variando de 77,3% a 88% nos tratamentos com microalgas (TISO - *Tisochrysis lutea*; TCHO - *Chaetoceros muelleri*; TIC - *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*) e sem microalga (TSM) na água de cultivo. Este resultado, possivelmente está relacionado com a diversidade de itens alimentares (copépodes, rotíferos e artêmia) utilizada durante esta fase. Randazzo et al. (2018), quando avaliaram a influência da dieta (copépodes e artêmia) no desenvolvimento inicial de *H. reidi* verificaram que o grupo alimentado com uma dieta mista de copépode (*Acartia tonsa*) e náuplios de artêmia obtiveram uma sobrevivência de 59%, enquanto somente com artêmia foi de 20,8%, e somente com copépode foi de 66,7%. Olivotto et al. (2008) também observaram uma maior sobrevivência em *H. reidi* quando incluíram o copépode cultivado (*Tisbe* spp.) como suplemento alimentar, sendo que, os grupos alimentados com uma dieta combinada de rotíferos, copépodes e náuplios de artêmia apresentaram maior sobrevivência do que aqueles alimentados com a dieta padrão (14% com rotífero e 10% com náuplios de artêmia).

Além da inclusão do copépode como suplemento alimentar, a espécie utilizada (*Parvocalanus crassirostris*) pode ter influenciado também no aumento da sobrevivência.

Schubert et al. (2016) quando avaliaram o efeito das espécies alimentares e da composição de HUFA na sobrevivência e crescimento de *H. reidi*, verificaram que a espécie de alimento vivo pode ser um fator determinante para a sobrevivência e crescimento dos juvenis de cavalos-marinhos. Alguns trabalhos sugerem que os copépodes calanóides, como a espécie *P. crassirostris* utilizada neste estudo, são alimentos ideais para larvas de peixes marinhos e cavalos-marinhos (Payne e Rippingale 2000; Randazzo et al., 2018) por serem pelágicos, conseqüentemente mais disponíveis como presas (Payne e Rippingale, 2001; Olivotto et al., 2008).

Assim como Celino et al. (2011) observaram durante a larvicultura de *H. kuda*, o presente estudo mostra que, além da oferta de uma dieta mista, a suplementação com “água verde” viabiliza a criação de juvenis em cativeiro, fornecendo uma alimentação adequada e estratégias que podem ser potencialmente aplicadas na criação em larga escala de cavalos-marinhos.

2. 5 CONCLUSÃO

A adição de microalgas na água de cultivo, especificamente da *Tisochrysis lutea* isolada ou combinada, durante os primeiros 15 dias de vida do cavalo-marinho, *H. reidi*, mostrou ser uma alternativa vantajosa em um sistema de alta produção, visto que sua inclusão afetou positivamente o desempenho das larvas (peso, taxa de crescimento específico e ganho de peso), e a composição lipídica das larvas em comparação ao tratamento sem adição da microalga (TSM).

2. 6 REFERÊNCIAS

- Blanco, A., Planas, M., & Moyano, F.J., 2016. Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses *Hippocampus guttulatus* fed on different live diets. *Aquaculture Research*, 47,3558–3569. <https://doi.org/10.1111/are.12806>
- Bell, J.G, McEvoy L.A., Estevez, A., Shields, R.J., Sargent, J.R., 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227, 211-220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00504-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00504-0)
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J.,1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Cahu, C., Infante, J. Z., Takeuchi, T., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227, 245-258. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00507-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00507-6)

Celino, F.T., Hilomen-Garcia, G.V., Norte-Campos, A.G.C., 2011 Feeding selectivity of the seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker), juvenile under laboratory conditions. *Aquaculture Research*, 43, 1804-1815. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02988.x>

Chang, M., Southgate, P. C., 2001. Effects of varying dietary fatty acid composition on growth and survival of seahorse, *Hippocampus* sp., juveniles. *Aquarium Sciences and Conservation*, 3, 205-214. <https://doi.org/10.1023/A:1011363807074>

Faleiro F, Narciso L., 2010. Lipid dynamics during early development of *Hippocampus guttulatus* seahorses: searching for clues on fatty acid requirements. *Aquaculture*, 307, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.005>

Figueiredo, J., Lin, J., Anto, J., Narciso, L., 2012. The consumption of DHA during embryogenesis as an indicative of the need to supply DHA during early larval development: a review. *Journal of Aquaculture Research and Development*. 3, 2–7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000140>

Filleul, M.A., 1996. Optimising Growth of Juvenile Big Bellied Seahorse *Hippocampus abdominalis* Leeson. Unpublished B. App. Sci., University of Tasmania, Australia. 100 pp.

Foster, S. J., Vincent, A. C. J., 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *Journal of fish biology*, 65, 1–61. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00429.x>

Galley, T.H., Batista, F.M., Braithwaite, R., King, J., Beaumont, A.R., 2010. Optimisation of larval culture of the mussel *Mytilus edulis* (L.). *Aquaculture International*, 18, 315-325. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9245-7>

Hjelmeland, K., Pedersen B.H., Nilssen, E.M., 1998. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacean prey. *Marine Biology*, 98, 331–335. <https://doi.org/10.1007/BF00391108>

Hora, M. dos S. C. da, & Joyeux, J. C., 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture*, 292, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.03.023>

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. URL. <http://www.redlist.org> (accessed 15.2.2020), 2019.

Izquierdo, M.S., Watanabe, T., Takeuchi, T., Arakawa, T., Kitajima, C., 1989. Requirement of larval Red Seabream *Pagrus major* for Essential Fatty Acids. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 859-867. <https://doi.org/10.2331/suisan.55.859>

Izquierdo, M.S., 2005. Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers. Options Méditerranéennes*, 63, 91– 102. <http://hdl.handle.net/10553/76446>

- Izquierdo, M.S., Koven, W.M. (2011) Lipídios. In: *Larval Fish Nutrition* (J. Holt ed.), pp. 47 – 82. Wiley-Blackwell, John Wiley and Sons, Oxford, Reino Unido.
- Kline, M. D., Laidley, C. W., 2015. Development of intensive copepod culture technology for *Parvocalanus crassirostris*: Optimizing adult density. *Aquaculture*, 435, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.022>
- Koldewey, H.J., Martin-Smith, K.M., 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, 302,131–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.010>
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R., 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265,194–205. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.043>
- Lee, C.S., Ostrowski, A.C., 2001. Current status of marine finfish larviculture in the United States. *Aquaculture*, 200, 89-109. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00695-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00695-0)
- Lourie, S. A., Foster, S. J., Cooper, E. W. T., & Vincent, A. C. J., 2004. A guide to the identification of seahorses. *Project Seahorse and TRAFFIC North America*, 114.
- Lund, I., Skov, P. V., Hansen, B. W., 2012. Dietary supplementation of essential fatty acids in larval pikeperch (*Sander lucioperca*); short and long term effects on stress tolerance and metabolic physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 162, 340-348. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.04.004>
- Lund, I., Höglund, E., Ebbesson, L.O.E., Skov, P. V., 2014. Dietary LC-PUFA deficiency early in ontogeny induces behavioural changes in pike perch (*Sander lucioperca*) larvae and fry. *Aquaculture*, 432, 453-461. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.039>
- Martínez-Fernández, E., Acosta-Salmón, H., Southgate, P.C., 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture*, 257, 491-503. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.022>
- Martinez-Cardenas, L., Purser, G. J., 2007. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile potbellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). *Aquaculture*, 264, 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.045>
- Mélo, R.C.S., Santos, L.P.S., Brito, A.P.M., Gouveia, A.A., Marçal, C., Cavalli, R.O., 2016. Use of the microalga *Nannochloropsis oculata* in the rearing of newborn longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) juveniles. *Aquaculture Research*, 47, 3934-3941. <https://doi.org/10.1111/are.12843>
- Mourente, G., Rodriguez, A., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 1993. Effects of dietary docosahexaenoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. *Aquaculture*, 112, 79-98. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90160-Z](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90160-Z)
- Moorhead, J. A., 2015. Research-scale tank designs for the larval culture of marine ornamental species, with emphasis on fish. *Aquacultural Engineering*, 64, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.11.004>

- Naas, K.E., Nress, T., Harboe, T., 1992. Enhanced first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in green water. *Aquaculture*, 105, 143–156. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(92\)90126-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90126-6)
- Neori, A., 2011. Green water microalgae: The leading sector in world aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 23, 143-149. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9531-9>
- Novelli, B., Socorro, J.A., Caballero, M.J., Otero-Ferrer, F., Segade-Botella, A. & Domínguez, L.M., 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1233–1251. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0082-5>
- Olivotto, I., Avella, M. A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C. C., Ruiz, P. N., & Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. *Aquaculture*, 283, 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.018>
- Olivotto, I., Tokle, N.E., Nozzi, V., L., Cossignani, Carnevali, O., 2010. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: a feeding study. *Aquaculture*. 30, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.033>
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G.J., Avella, M.A., Calado, R., 2011. Advances in Breeding and Rearing Marine Ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*. 42, 135-166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.00453.x>
- Palma, J., Bureau, D. P., Andrade, J. P., 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, 318, 439–443. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.05.035>
- Palmer, P.J., Burke, M.J., Palmer, C.J., Burke, J.B., 2007. Developments in controlled green-water larval culture technologies for estuarine fishes in Queensland, Australia and elsewhere. *Aquaculture*, 272, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.06.018>
- Payne, M., Rippingale, R., 2000. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, 188, 353–361. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00349-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00349-5)
- Planas, M., Olivotto, I., González, M. J., Rosaria, L., Zarantoniello, M., 2020. A Multidisciplinary Experimental Study on the Effects of Breeders Diet on Newborn Seahorses (*Hippocampus guttulatus*). *Original Research*, 7, 638. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00638>
- Randazzo, B., Rolla, L., Ofelio, C., Planas, M., Gioacchini, G., Vargas, A., Giorgini, E., Olivotto, I., 2018. The influence of diet on the early development of two seahorse species (*H. guttulatus* and *H. reidi*): Traditional and innovative approaches. *Aquaculture*, 490, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.02.029>
- Rico-Villa, B., Le Coz, J.R., Mingant, C., Robert, R., 2006. Influence of phytoplankton diet mixtures on microalgae consumption, larval development and settlement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 256, 377-388. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.02.015>

- Sales, R., de Souza-Santos, L.P. (2020). Production of concentrated inocula from the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture International*, 28, 1609–1620. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00546-9>
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., Bell J. G., 2002. The Lipids. *Fish Nutrition*, 2003, 181-257. <https://doi.org/10.1016/B978-012319652-1/50005-7>
- Shah, M. R. Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, M. Parsemer, A., Liang, Y., Daronch, M., 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30, 197–213. DOI: 10.1007/s10811-017-1234-z
- Silveira, R. B., Siccha-Ramirez, R., Silva, J. S., & Oliveira, C., 2014. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. *Zootaxa*, 3861, 317–332. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3861.4.2>
- Sorgeloos, P., Dhert, P., Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200, 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00698-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00698-6)
- Souza, A.P., L. Ferreira, T. Mouriño, J. L. P. Martins, M. L., Magenta Magalhães, A. R., Tsuzuki, M. Y., 2020. Use of *Artemia* supplemented with exogenous digestive enzymes as sole live food increased survival and growth during the larviculture of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*. *Aquaculture Nutrition*, 26, 964–977. <https://doi.org/10.1111/anu.13054>
- Stuart, K.R., Drawbridge, M., 2011. The effect of light intensity and green water on survival and growth of cultured larval California yellowtail (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 321,152–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.023>
- Tocher, D. R., 2010. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research*, 41, 717-732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02150.x>
- Van der Meeen, T., Tensen-Mangor, J., Pikova, J., 2007. The effect of green water and light intensity on survival, grow the and lipid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*) during intensive rearing. *Aquaculture*, 265, 206-277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.042>
- Vendruscolo, R., Deprá, M. C., Pinheiro, P. N., Furlan, Valcenir, J. M., Barin, J.S., Cichoski, A. J., Menezes, C. R., Zepka, L. Q. Jacob-Lopes, E, Wagner, R., 2022. Food potential of *Scenedesmus obliquus* biomasses obtained from photosynthetic cultivations associated with carbon dioxide mitigation. *Food Research International*, 160, 111590. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111590>
- Visentainer, J. V., 2012. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35, 274-279. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000200008>
- Villeneuve, L., Gisbert, E., Zambonino-Infante, J. L., Quazuguel,P., Cahu, C. L., 2005. Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. *British Journal of Nutrition*, 94, 877–884. <https://doi:10.1079/BJN20051560>

Watanabe, T., Izquierdo, M. S., Takeuchi, T., Satoh, S., Kitajima, C., 1989. Comparison Between Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Terms of Essential Fatty Acid Efficacy in Larval Red Seabream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 9, 1635-1640. <https://doi.org/10.2331/suisan.55.1635>

Wang, J., Shu, X., Wang, W. X., 2019. Micro-elemental retention in rotifers and their trophic transfer to marine fish larvae: influences of green algae enrichment. *Aquaculture*, 499,374-380. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.09.066>

Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Melo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araujo-Castro, C.M., Galvão, D.B., Gouveia, A., Regis, C.G., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture*, 360–361, 10-16. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.025>

Wilson, J. M., & Castro, L. F. C., 2010. Morphological diversity of the gastrointestinal tract in fishes. *Fish Physiology*, 30, 1–55. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(10\)03001-3](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(10)03001-3)

Woods, C. M. C., 2005. Growth of cultured seahorses (*Hippocampus abdominalis*) in relation to feed ration. *Aquaculture International*, 13,305–314. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-3100-7>

Zambonino, J. L. I., Cahu, C.L., 1999. High Dietary Lipid Levels Enhance Digestive Tract Maturation and Improve *Dicentrarchus labrax* Larval Development. *The Journal of Nutrition*, 129, 1195–1200. <https://doi.org/10.1093/jn/129.6.1195>

Zhang, D., Lin, T., Liu, A., 2015. Comparison of growth, survival, and fatty acid composition of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*, juveniles fed enriched *Artemia* and a calanoid copepod, *Schmackeria dubia*. *Journal of the World Aquaculture Society*,46, 608-616. <https://doi.org/10.1111/jwas.12233>

3 ARTIGO 2.

O uso da microalga *Tisochrysis lutea* em sistema de “água verde” aumenta a área de absorção no intestino de larvas do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933

Use of the microalgae *Tisochrysis lutea* in a “green water” system increases the absorption area in the intestine of seahorse larvae *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933

Elen Monique de Oliveira SOUSA ^a, Nayara Yoshimini de OLIVEIRA ^a, Ianka Agra da SILVA ^a, Renata Ávila OZÓRIO ^a, Emilly Monteiro LOPES ^b, Mônica Yumi TSUZUKI ^a

^a Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM) Departamento de Aquicultura, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

^b Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos (AQUOS) Departamento de Aquicultura, CCA, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil

Abstract: The objective of the present study was to verify the influence of different microalgae used in rearing larviculture water (green water technique) on the intestinal morphology of the seahorse, *Hippocampus reidi* during the first 15 days of life. Four treatments were tested consisting of two microalgae (*Tisochrysis lutea*- ISO and *Chaetoceros muelleri*-CHO), used alone (TISO and TCHO) or combined (TIC, 1:1) in the larval rearing water, and a treatment without the microalgae (TSM). Larvae were fed from the first to the seventh day with copepods (*Parvocalanus crassirostris*; 2 ind mL⁻¹) and rotifers (*Brachionus rotundiformis*; 8 ind mL⁻¹), and from the eighth day onwards with *Artemia* sp. nauplii (2 ind mL⁻¹). Results found in the present study clearly show that there was a significant increase in the weight and weight gain of larvae in the 15th in treatments with the addition of the microalgae *T. lutea*, whether alone or in combination with algae, when compared to TSM. In relation to intestinal histomorphometry, larvae from TISO presented higher villus height values (85.29±1.23 µm) when compared to larvae from TSM (69.42±2.82 µm) and TCHO (76.92± 2.23 µm) but did not show significant differences when compared with the TIC (80.127± 2.08 µm) which directly reflected in the surface area of the villi. Larvae of TISO (3,603.43±151.31 µm) and TIC (3,550.29±120.99 µm) presented higher and significant values in relation to TSM (3,026.79±147.64 µm) and TCHO (3,069.09±126.18 µm) (P<0.05). It is concluded that the protocol developed in this study for rearing *H. reidi* larvae in a green water system with the addition of the microalgae *T. lutea* resulted in an increase in the intestinal absorption area resulting in an improvement in the zootechnical performance of the larvae.

Key words: Absorption, Nutrition, Intestinal Histology, Green Water

Resumo: O objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes microalgas utilizadas na água de cultivo “água verde” na morfologia intestinal do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* durante os primeiros 15 dias de vida. Foram testados quatro tratamentos constituídos por duas microalgas (*Tisochrysis lutea*-ISO e *Chaetoceros muelleri*-CHO), utilizadas isoladamente (TISO e TCHO) ou combinadas (TIC, 1:1) na água de criação larval, e um tratamento sem a microalga (TSM). As larvas foram alimentadas do primeiro ao sétimo dia com copépodes (*Parvocalanus crassirostris*; 2 ind mL⁻¹) e rotíferos (*Brachionus rotundiformis*; 8 ind mL⁻¹), e a partir do oitavo dia com náuplios de *Artemia* sp. (2 ind mL⁻¹). Os resultados encontrados no presente estudo mostram claramente que houve aumento

significativo no peso e ganho de peso das larvas no 15º dia nos tratamentos com adição da microalga *T. lutea*, seja ela sozinha ou combinada quando comparado ao TSM. Em relação à histomorfometria intestinal, as larvas do TISO apresentaram maiores valores de altura das vilosidades ($85,29 \pm 1,23 \mu\text{m}$) quando comparadas às larvas do TSM ($69,42 \pm 2,82 \mu\text{m}$) e do TCHO ($76,92 \pm 2,23 \mu\text{m}$), mas não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com as larvas do TIC ($80,127 \pm 2,08 \mu\text{m}$), o que refletiu diretamente na área superficial das vilosidades. Larvas do TISO ($3.603,43 \pm 151,31 \mu\text{m}$) e TIC ($3.550,29 \pm 120,99 \mu\text{m}$) apresentaram valores maiores e significativos em relação a TSM ($3.026,79 \pm 147,64 \mu\text{m}$) e TCHO ($3.069,09 \pm 126,18 \mu\text{m}$) ($P < 0,05$). Conclui-se que o protocolo desenvolvido neste estudo para criação de larvas de *H. reidi* em sistema de “água verde” com adição da microalga *T. lutea* resultou em aumento da área de absorção intestinal resultando em melhora no desempenho zootécnico das larvas.

Palavras- chave: Absorção, Nutrição, Histologia do Intestino, Água Verde

3. 1 INTRODUÇÃO

No litoral brasileiro são encontradas três espécies de cavalo-marinhos: *Hippocampus reidi*, *H. erectus* e *H. patagonicus* (Silveira, et al., 2014). Dentre estas espécies, *H. reidi*, tem grande importância comercial e representatividade no mercado de ornamentais marinhos devido à sua coloração, que varia entre preto, marrom, marrom avermelhado, laranja e amarelo, pelo seu tamanho, e por ser bastante utilizado na medicina tradicional chinesa e no uso para souvenirs (Lourie et al., 1999; Monteiro-Neto et al., 2003; Foster, 2016). Entretanto, *H. reidi* incluída na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (Oliveira; Pollom, 2017) como Quase Ameaçada (NT), e no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada como vulnerável (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018).

A produção em cativeiro é uma ferramenta que pode proporcionar o uso sustentável e legal de várias espécies de peixes (Foster et al., 2016; Mustafa et al., 2021). Entretanto, em relação ao cultivo de cavalos marinhos ainda existem uma série de entraves para melhorar as condições de cultivo e torná-la comercialmente viável, e um dos principais obstáculos na produção dessas espécies são os aspectos nutricionais e alimentares, principalmente nas fases iniciais de cultivo (Willadino et al., 2012; Souza-Santos, Regis, Mélo, & Cavalli, 2013 ; Blanco, Planas, & Moyano, 2016; Novelli et al., 2015, 2016; Sales et al., 2016; Randazzo et al., 2018; Ofelio, Díaz, Radaelli, & Planas, 2018). Assim, a adequação das exigências nutricionais e os padrões de alimentação ainda permanecem como um gargalo para o sucesso do cultivo de cavalos-marinhos em larga escala (Olivotto et al., 2011).

Em trabalhos realizados com *H. reidi*, observou-se que ao nascer, os filhotes já apresentam alguns sistemas fisiológicos altamente funcionais, como o visual e o locomotor, enquanto outros aumentam gradualmente sua funcionalidade, como o digestivo (Novelli et al., 2015), o que reflete na baixa atividade de enzimas digestivas (Souza et al., 2020), podendo afetar diretamente a sobrevivência e o crescimento dos mesmos. Alguns trabalhos já vêm demonstrando que a utilização de enriquecedores comerciais no alimento-vivo ofertado proporciona uma melhora na sobrevivência e crescimento em espécies de cavalos-marinhos (Woods, 2005, Martinez-Cardenas; Purser, 2007, Palma et al., 2011), assim como a utilização de enzimas digestivas exógenas (Souza et al., 2020).

Além da utilização dos enriquecedores comerciais, a utilização de microalgas na água de cultivo durante a larvicultura, técnica conhecida como “água verde”, também tem mostrado melhora na sobrevivência e no crescimento de larvas de peixes marinhos, como no linguado (*Hippoglossus hippoglossus*) (Naas et al., 1992), no pargo europeu ou dourada (*Sparus aurata*)

(Papandroulakis et al., 2002), no pregado (*Scophthalmus maximus*) (Oie et al., 1997), no bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) (Van der Meeren et al., 2007), no cavalo-marinho do focinho longo (*H. reidi*) (Mélo et al. 2016), assim como aumentou também a taxa de sobrevivência de larvas de baixa qualidade do cavalo-marinho raiado (*H. erectus*) (Liu et al., 2023).

As microalgas são consideradas fontes de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, contêm pigmentos e ainda possuem atividades antimicrobianas e antioxidantes (Wikfors e Ohno, 2001; Kaparapu, 2018). Os efeitos benéficos associados à “água verde” têm sido atribuídos a uma variedade de fatores, incluindo: ingestão intencional e não intencional de células de algas (Reitan et al., 1997; Palmer et al., 2007), manutenção da qualidade nutricional de presas vivas (Reitan et al., 1997), melhora na taxa de ingestão alimentar pelas alterações das condições ambientais através do sombreamento (Naas et al., 1992) e estímulo de secreção de enzimas digestivas pelas larvas (Cahu e Zambonino-Infante, 1998). Além disso, as microalgas apresentam atividades antibacteriana contra bactérias patogênicas e oportunistas (Kokou, et al., 2012) e possuem substâncias antibacterianas e antioxidantes que controlam os genes de virulência (Natrah et al., 2014).

Apesar dos benefícios mostrados em inúmeros estudos com a larvicultura de peixes marinhos utilizando a técnica de “água verde”, a influência da utilização de microalgas na larvicultura e no desenvolvimento do sistema digestivo em larvas de *Hippocampus reidi* ainda não foi testado. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do uso de microalgas na larvicultura, no aumento da área de absorção intestinal do cavalo marinho, em *H. reidi* durante os primeiros 15 dias de vida.

3. 2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de estudo

O trabalho foi realizado no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), localizado na Estação de Maricultura Elpídio Beltrame, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil. Os procedimentos realizados durante o experimento seguiram o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA-UFSC / 5542220321).

3.2.2 Origem e aclimação dos reprodutores

Reprodutores (n= 24) de *H. reidi* Ginsburg, 1933 foram coletados na Baía do Espírito Santo (Vitória- ES, Brasil, 20°19' S, 40°20' W), com autorização ICMBio SISBIO n°76002-1. Durante os 35 dias de quarentena, os animais foram mantidos em aquários de 140 L conectados a um sistema de recirculação de água salgada, equipado com filtro mecânico (bag), skimmer, filtros biológicos e ultravioleta. O fotoperíodo diário utilizado foi de 12 horas de luz.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com camarões carídeos *Palaemon* sp. (Weber, 1795), coletados numa lagoa nas proximidades do Laboratório de Ictiologia e Ictioplâncton (ICTOLAB- ES). Após a captura, os camarões eutansiados e inteiros (comprimento total de $22,89 \pm 2,02$ mm- média \pm desvio padrão; e peso total $103,58 \pm 33,38$ mg) foram lavados em água doce e congelados. Antes do seu uso como alimento para reprodutores de cavalos-marinhos, estes eram enriquecidos com uma mistura de óleo de fígado de bacalhau (ácidos graxos totais Ômega-3: 24%, DHA: 12%, EPA 8%; Mollers Tran, Noruega) e espirulina seca (proteína: 63,5%, carboidrato: 16,1%, lipídios: 0,8%; Alga Bloom microalgas, Brasil) na proporção de 1:3, injetada ($65 \pm 0,02$ mg) em cada camarão com auxílio de seringas de 5 mL (adaptação da metodologia utilizada no ICTOLAB).

3.2.3 Cultivo de alimento vivo

Os rotíferos *Brachionus rotundiformis*, provenientes do Laboratório de Peixes Marinhos (LAPMAR), UFSC, foram mantidos em tanques de 50 L a 26 ± 2 °C de temperatura e 25 de salinidade, alimentados com microalga *Nannochloropsis oculata* de acordo com a densidade de rotíferos. Antes de serem fornecidos para as larvas de cavalo-marinho, foram enriquecidos com Red Pepper (Bern Aqua NV, Bélgica), produto de enriquecimento suplementar para rotíferos e artêmia, por 6 horas de acordo com a recomendação do fabricante, sendo posteriormente lavados e filtrados em uma malha de 60 μ m, antes de serem ofertados às larvas.

Os copépodes *Parvocalanus crassirostris* foram mantidos no Laboratório de Peixes e Ornamentais Marinhos (LAPOM), UFSC, sendo cultivados em recipientes de 200 L e alimentados com as microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Tisochrysis lutea* de acordo com a densidade de copépodes (Kline; Laidley, 2015). Para concentrar os copépodos utilizou-se uma malha de 45 μ m, e após a filtragem uma mistura de náuplios, copepoditos e adultos foram lavados e fornecidos às larvas.

Os cistos de artêmia (PortoCyst, Natal, Brasil) foram colocados para eclosão a partir do 7º dia de experimento, em recipiente aerado e iluminado, salinidade de 35 e temperatura de 28 °C. Após 24 h, os náuplios foram separados dos cistos, lavados e ofertados às larvas de cavalo-marinho.

3.2.4 Cultivo de microalgas

Cepas das microalgas *C. muelleri* (CCMP 1316) e *T. lutea* (CCMP 1324), provenientes do Laboratório de Moluscos Marinhos (LMM), UFSC, foram cultivadas para serem fornecidas ao alimento vivo e para a manutenção da “água verde” nos sistemas de larvicultura durante todo o período experimental, sendo repicadas semanalmente a fim de manter os cultivos sempre em fase exponencial de crescimento. A biomassa foi produzida no Laboratório de Cultivo Algas (LCA), UFSC, em frascos de 2 L contendo o meio LCA-AM (Sales et al, 2020). As culturas foram mantidas em sala com temperatura controlada de 22 °C, com agitação constante através da injeção de ar comprimido enriquecido com 0,5% de CO² (v/v).

3.2.5 Delineamento e Procedimento Experimental

Após o nascimento, 30 larvas de cavalo-marinho foram distribuídas aleatoriamente e mantidas em cada um dos 12 tanques circulares de PVC com volume total de 3 L, na densidade de 10 larvas /L. O experimento teve duração de 15 dias e foi realizado em um sistema de recirculação de água, equipado com skimmer, filtro biológico de mídias de cerâmica e “bag” filtrante de 100 µm. A troca de água permaneceu desligada durante o dia, sendo ligada durante a noite para a retirada de microalgas e alimento vivo residuais. As unidades amostrais utilizadas neste trabalho e o sistema de manutenção para a larvicultura foram confeccionados de acordo com a metodologia adaptada de Moorhead (2015).

Foram testados quatro tratamentos em triplicata: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri* na proporção de 1:1.

Diariamente, antes da primeira alimentação, as microalgas eram adicionadas às unidades experimentais a uma concentração de 200.000 cel mL⁻¹ de cada espécie (Kline; Laidley, 2015), sendo estimada por contagem em microscópio com o auxílio da câmara de Neubauer. As larvas de *H. reidi* foram alimentadas três vezes ao dia (09:00, 13:00 e 17:00),

sendo do 1º ao 7º dia com rotíferos *Brachionus rotundiformis* (8 ind. mL⁻¹) e com copépodes *Parvocalanus crassirostris* (2 ind. mL⁻¹), e a partir do 8º dia foi ofertado de forma gradual náuplios de artêmia (2 ind. mL⁻¹). Antes da alimentação, a contagem residual do alimento vivo era realizada para a reposição e a manutenção da densidade adequada.

O fotoperíodo utilizado foi de 14 horas luz (lâmpadas fluorescentes de 15 W). Os parâmetros físicos e químicos da água foram avaliados diariamente antes da primeira alimentação. A temperatura e o oxigênio foram mensurados com o Oxímetro (MO-920-Instrutherm) e mantiveram-se em torno de $27,80 \pm 0,05$ °C, $6,3 \pm 0,07$ mg L⁻¹, respectivamente, a salinidade manteve-se em $30 \pm 0,09$, verificada com refratômetro óptico (Soma SHR-10 ATC) e o pH manteve-se em $8,03 \pm 0,01$, aferido através do pHmetro de bancada (AZ-86505).

3.2.6 Desempenho zootécnico

O crescimento das larvas de cavalo-marinho, em comprimento total (mm) e em peso úmido (mg), foi estimado através da média de 30 indivíduos no dia do nascimento, e da média de 15 indivíduos por tratamento no 7º dia e no final do experimento (15º dia). As larvas foram eutanasiadas com óleo de cravo (1,5 mL L⁻¹) (Eugenol, Maquira, Brasil) antes da biometria. O comprimento total (em mm) foi definido como o somatório da altura da coroa, do tronco até comprimento da cauda (Lourie et al., 2004), as medidas foram realizadas através do software Dino Capture, a partir de uma câmera USB Dino-Eye acoplada a uma lupa estereoscópica binocular na medição das larvas. O peso (úmido) dos indivíduos foi aferido com uma balança analítica de precisão (0,001 g).

3.2.7 Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas no Laboratório de Sanidade de Organismos Aquáticos, Departamento de Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Para cada grupo experimental, indivíduos (n = 5) foram retirados em cada tempo de amostragem (inicial, 7 dias e 15 dias) e fixados em formaldeído a 10% por 24 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para álcool 70%, iniciando a desidratação gradual com álcool etílico de 80, 90 e 100%, sendo adotado o intervalo de uma hora a cada banho. A diafanização foi realizada por banho de solução de álcool 100% + Xilol seguido de três banhos de Xilol, e a parafinização realizada com três banhos de parafina com intervalos de 1 h com posterior inclusão para obtenção de blocos. Os cortes histológicos foram realizados com

micrótomo manual (Leica®) em espessura de 5 µm, sendo corados com hematoxilina e eosina (H&E). A análise das lâminas histológicas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico (ZEISS, Axio Imager A.2, Gottingen, Germany) e para avaliar a histomorfometria do intestino, foram medidos os seguintes parâmetros (µm²): altura e largura das vilosidades, e a área de superfície aparente das vilosidades = altura das vilosidades × largura das vilosidades.

3.2.8 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade e distribuição dos dados. Como os dados apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância (ANOVA - One Way) para determinação de possíveis diferenças entre as variáveis, e o teste de Tukey ao nível de 5,0% de significância também foi aplicado com a utilização do software Sigma Plot.14. Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão.

3. 3 RESULTADOS

3.3.1 Crescimento e ganho de peso das larvas

No 15º dia, os peixes apresentaram valores maiores (1,2 vezes) e similares de peso nos tratamentos com a microalga *Tisochrysis lutea* (TISO) e no combinado das duas microalgas (*Tisochrysis lutea* e *Chaetoceros muelleri*) (TIC) quando comparados com os valores dos tratamentos sem a adição de microalga (TSM) e com a microalga *Chaetoceros muelleri* (TCHO) (P<0,05), que não diferiram entre si. O ganho de peso das larvas após 15 dias de cultivo nos tratamentos TISO e TIC foram significativamente maiores (1,1x) quando comparados ao TSM (P<0,05), mas não diferiram em relação ao TCHO. Em relação ao comprimento total das larvas, ao final do experimento, nenhum dos tratamentos com a adição de microalgas induziu alterações significativas neste parâmetro (Tabela 1). Não foram detectadas diferenças significativas no peso, na altura e ganho de peso nos tratamentos testados aos sete dias após o nascimento (P>0,05).

Tabela 1. Parâmetros zootécnicos de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* com 7 e 15 dias após o nascimento submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO - adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC - adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*.

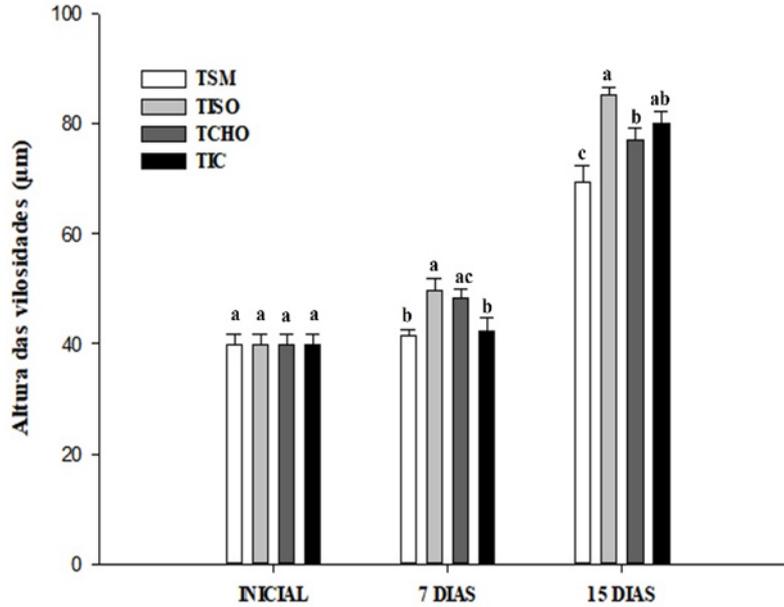
	TSM	TISO	TCHO	TIC
7 DIAS				
Peso (mg)	3,90±1,83 ^a	5,20±1,83 ^a	4,78±0,98 ^a	4,36±0,89 ^a
Altura (mm)	8,83±1,84 ^a	10,01±0,53 ^a	10,78±0,58 ^a	10,15±0,72 ^a
Ganho de Peso (mg)	0,95±0,91 ^a	1,60±0,88 ^a	1,39±0,49 ^a	1,39±0,44 ^a
15 DIAS				
Peso (mg)	20,91±2,93 ^b	25,91±4,77 ^a	21,68±2,75 ^b	25,47±2,64 ^a
Altura(mm)	18,72±0,67 ^a	19,24±1,00 ^a	18,72±0,74 ^a	19,16±0,78 ^a
Ganho de Peso (mg)	9,14±0,91 ^b	11,29±0,26 ^a	9,95±0,39 ^{ab}	11,53±0,86 ^a

*Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).
Dados apresentados como média ± desvio padrão

3.3.2 Análise Histológica

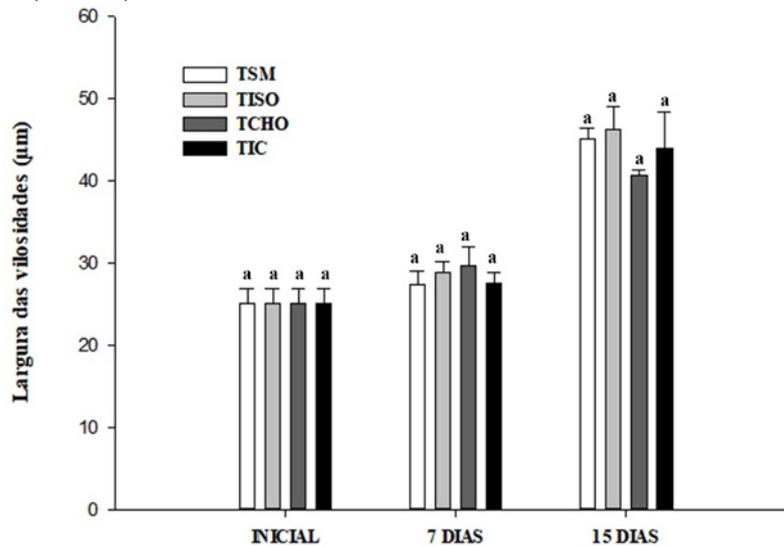
Ao nascer, a altura, a largura e a área da superfície das vilosidades do intestino das larvas de cavalo-marinho foram ($39,83 \pm 1,84 \mu\text{m}$, $25,04 \pm 1,91 \mu\text{m}$ e $1064,43 \pm 77,02 \mu\text{m}^2$), respectivamente. No 7º dia, os valores de altura das vilosidades das larvas do TISO foram significativamente maiores que as larvas do TSM, assim como no 15º dia, a altura das vilosidades do intestino das larvas do TISO apresentaram valores significativamente maiores ($85,29 \pm 1,23 \mu\text{m}$) quando comparadas com as larvas do TSM ($69,42 \pm 2,82 \mu\text{m}$) e TCHO ($76,92 \pm 2,23 \mu\text{m}$), mas não mostrou diferenças significativas quando comparadas com o TIC ($80,13 \pm 2,08 \mu\text{m}$) ($P < 0,05$) (Figura 1).

Figura 1. Altura das vilosidades (μm) (média \pm DP) de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO-adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).



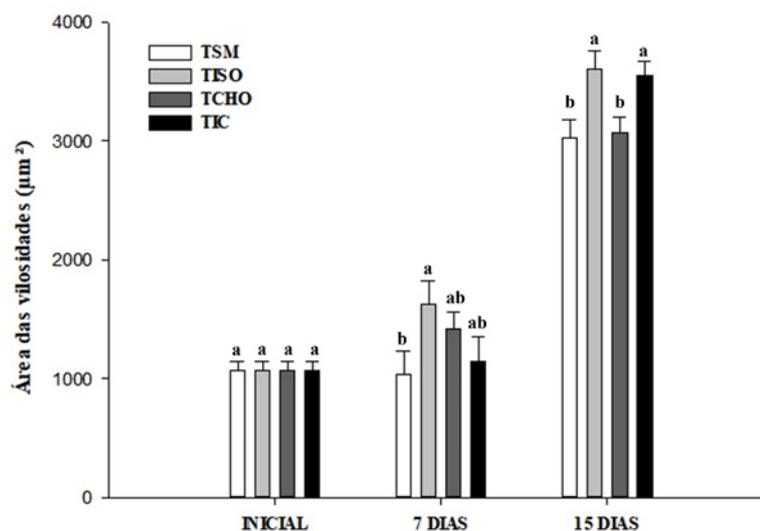
Em relação a largura das vilosidades, não foram encontradas diferenças de valores entre as larvas nos diferentes tratamentos tanto no 7º quanto no 15º dia (Figura 2).

Figura 2. Largura das vilosidades (μm) (média \pm DP) de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO-adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).



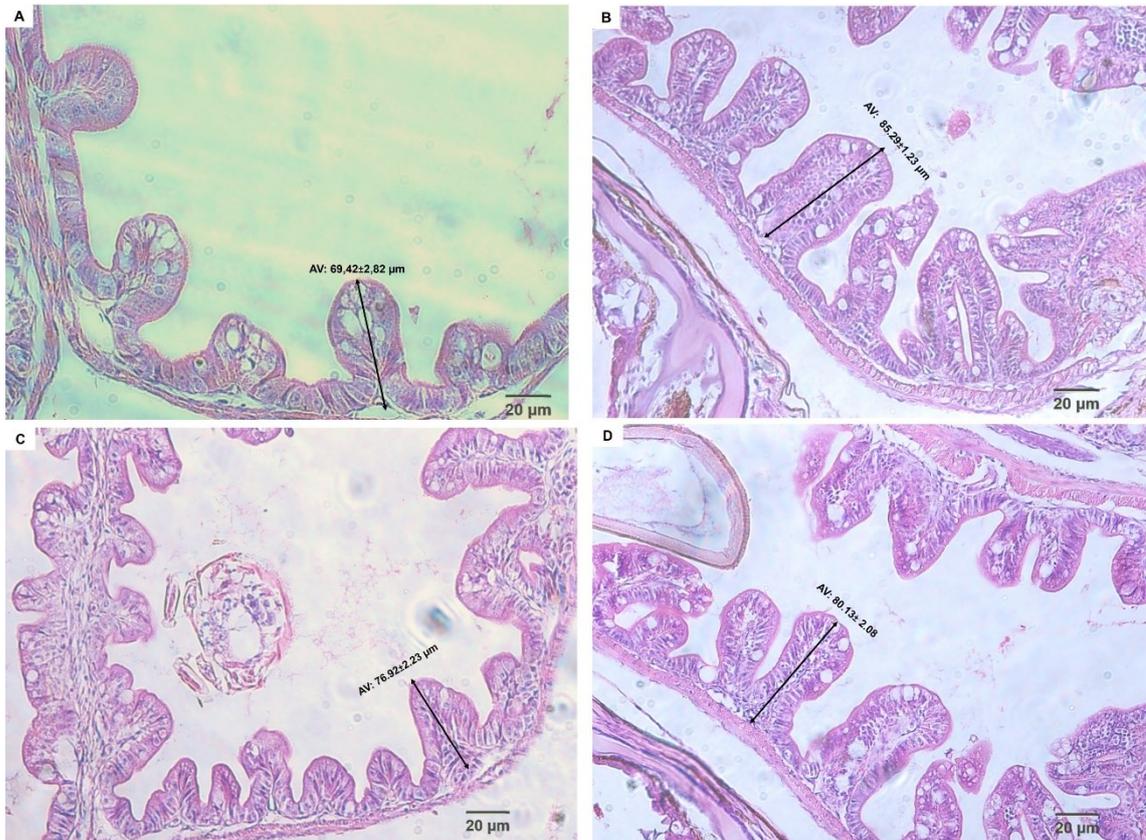
No 7º dia de larvicultura, foram encontradas diferenças significativas nos valores de área de superfície do intestino das larvas do TISO ($1630,06 \pm 190,56 \mu\text{m}^2$) quando comparadas com o tratamento TSM ($1036,18 \pm 196,07 \mu\text{m}^2$) ($P < 0,05$), mas não mostrou diferenças significativas quando comparadas com os demais tratamentos com adição de microalga. No 15º dia, observou-se um aumento significativo nos valores da área da superfície das vilosidades do intestino das larvas que estavam no TISO ($3603,43 \pm 151,31 \mu\text{m}^2$) e TIC ($3550,29 \pm 120,99 \mu\text{m}^2$) ($P < 0,05$), que não apresentaram diferenças significativas entre si, entretanto, foram significativamente maiores em relação as larvas do TSM e o TCHO que também não diferiram entre si ($P > 0,05$) (Figura 3).

Figura 3. Área da superfície das vilosidades (μm^2) (média \pm DP) de larvas e juvenis de *Hippocampus reidi* submetidos aos diferentes tratamentos: TSM - sem adição de microalgas; TISO- adição da microalga *Tisochrysis lutea*; TCHO- adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; TIC- adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$)



As microfotografias do intestino das larvas do cavalo-marinho *H. reidi* nos diferentes tratamentos com ou sem a adição de microalgas no 15º dia mostram as alterações significativas na altura das vilosidades do intestino das larvas nos tratamentos com adição de microalgas em relação ao TSM (Figura 4).

Figura 4. Microfotografias do intestino de juvenis do cavalo marinho *Hippocampus reidi* com 15 dias nos diferentes tratamentos com ou sem microalgas (A)-TSM - sem adição de microalgas;(B) -TISO-adição da microalga *Tisochrysis lutea*, (C)-TCHO-adição da microalga *Chaetoceros muelleri*; (D)-TIC-adição da microalga *Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*. AV- Altura da vilosidade.



3. 4 DISCUSSÃO

A mucosa intestinal é de fundamental importância para que os processos digestivos, absorptivos e metabólicos ocorram de forma efetiva em peixes teleósteos e o aumento do comprimento das vilosidades implica em um aumento da área de superfície para maior absorção dos nutrientes disponíveis (Caspary 1992). No presente estudo foi possível observar que a inclusão das microalgas, especialmente nos tratamentos com a inclusão da *Tisochrysis lutea* (TISO) no sistema de larvicultura de *H. reidi* contribuiu com o aumento da altura e consequentemente com o aumento da área de absorção intestinal das larvas com 15 dias de vida, o que resultou também na melhora do desempenho zootécnico das larvas no mesmo tratamento.

Souza et al. (2020) quando avaliaram a área da superfície aparente das vilosidades intestinais de larvas de *H. reidi* com 15 dias de idade alimentadas com artêmia suplementada com enzimas exógenas de pancreatina suína em diferentes concentrações observaram que, no tratamento com a inclusão de 50 mg/L de pancreatina, a área das vilosidades chegou a medir $3.587,16 \pm 803,29 \mu\text{m}^2$, valor este que se aproxima da área da superfície das larvas na mesma

idade no presente estudo no TISO ($3.603,43 \pm 151,31 \mu\text{m}^2$) e no TIC (*Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*) ($3.550,29 \pm 120,99 \mu\text{m}^2$), apenas com inclusão de microalgas na água de cultivo (sem a utilização de suplementação com enzimas exógenas).

As microalgas podem ser ingeridas acidentalmente e servir como fonte direta de nutrientes, podendo estimular a síntese de enzimas endógenas e fornecer enzimas exógenas que podem estar auxiliando na digestão do alimento ofertado (Van der Meeren, 1991; Cachu & Zambonino, 1998; Hjelmeland, Pedersen & Nilssen 1998). No presente estudo, a adição da microalga *T. lutea* sozinha (TISO) ou combinada (TIC) aumentou a altura e área superficial das vilosidades intestinais, conseqüentemente aumentando a absorção de nutrientes, influenciando diretamente no desempenho dos cavalos-marinhos (Casparly 1992). Ao adicionar a microalga *Isochrysis galbana* durante a larvicultura do robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*), a mesma afetou as funções digestivas pancreáticas e intestinais durante o desenvolvimento larval, resultando no aumento da atividade da tripsina (Cachu & Zambonino, 1998). No presente estudo não foi possível verificar se houve alguma ação enzimática com a inclusão das microalgas que poderia ter contribuído com a melhora da absorção do alimento, refletindo na melhora do desenvolvimento larval.

No ambiente aquático as microalgas estão na base da cadeia alimentar e são essenciais para a criação comercial de vários tipos de animais aquáticos, utilizadas como fonte de alimento para organismos que fazem parte do zooplâncton (Spolaore et al, 2006; Duy et al, 2017). Dentre os alimentos mais utilizados durante a larvicultura de peixes ornamentais marinhos, destaca-se os rotíferos e artêmia, no entanto, não são considerados ideais para larvas de cavalo-marinho por apresentarem dificuldade quanto à sua digestão (Olivotto et al., 2011; Blanco et al., 2016). Consideradas fontes de proteínas, lipídios, carboidratos, minerais, vitaminas, contêm pigmentos e ainda possuem atividades antimicrobianas e antioxidantes (Wikfors e Ohno, 2001; Kaparapu, 2018). Assim, a utilização das microalgas em um sistema de “água verde” durante a larvicultura de peixes marinhos, além de já fazerem parte do habitat natural dos peixes, podem contribuir com o desempenho das larvas, melhorando o funcionamento do sistema digestivo, e regulando bactérias oportunistas pela sua ação antibacteriana ou probiótica (Naviner et al., 1999).

Embora alguns autores e protocolos de criação de cavalos-marinhos mencionem a adição de microalgas durante a larvicultura (Gomez-Jurado e Gardner 2005; Olivotto et al, 2008; Willadino et al, 2012; Pham e Lin 2013; Mélo et al, 2016; Liu et al., 2023), estudos que avaliem a influência das microalgas no sistema digestivo de cavalos-marinhos ainda são escassos. Os cavalos-marinhos apresentam um trato intestinal simples, sem estômago funcional, o que pode dificultar ainda mais a digestão do alimento ofertado (Novelli et al., 2015; Palma et

al., 2014). Desta forma, compreender a morfologia intestinal destes peixes é de fundamental importância para o desenvolvimento de protocolos que estimulem sua funcionalidade e eficiência, assim como a formulação de dietas que atendam às exigências nutricionais de cavalos-marinhos.

3. 5 CONCLUSÃO

Conclui-se que, o protocolo desenvolvido neste estudo para a criação de larvas de *H. reidi* em um sistema de “água verde” com a adição da microalga *T. lutea* tanto no tratamento isolada quanto no combinado das algas resultou em um aumento da área de absorção intestinal, e por consequência melhorou o desempenho zootécnico das larvas. No entanto, mais pesquisas são necessárias para identificar os mecanismos precisos responsáveis pelo aumento da área das vilosidades intestinais em uma cultura de “água verde”, assim como para avaliar o efeito de diferentes espécies e concentrações de microalgas.

3. 6 REFERÊNCIAS

- Blanco, A., Planas, M., & Moyano, F.J., 2016. Ontogeny of digestive enzymatic capacities in juvenile seahorses *Hippocampus guttulatus* fed on different live diets. *Aquaculture Research*, 47,3558–3569.
- Caballero, M.J., Izquierdo, M.S., Kjørsvik, E., Socorro, D.J.M., Fernandez, A.J, Rosenlund, G., 2003. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225, 325-340.
- Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., 1998. Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing effect on digestive enzymes. *Aquaculture*, 161, 479-489
- Caspary, W.F., 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *The American Journal Clinical. Nutrition*. 55, 299-308
- Duy, N.D.Q.; Francis, D.S.; Southgate, P.C., 2017. The nutritional value of live and concentrated micro-algae for early juveniles of sandfish, *Holothuria scabra*. *Aquaculture*, 473, 97–104.
- Foster, S., Wiswedel, S., Vincent, A., 2016. Opportunities and challenges for analysis of wildlife trade using CITES data—seahorses as a case study. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 26, 154–172.
- Gonçalves, L.U., Rodrigues, A.P.O., Moro, G.V., Cargnin-Ferreira E. & Cyrino J.E.P., 2012. Morfologia e Fisiologia do Sistema Digestório de Peixes, p.9. In: Fracalossi D.M. & Cyrino J.E.P. (Eds), NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, SC

- Gomez-Jurado, J. & Gardner, T., 2005. Slender seahorse *Hippocampus reidi*. In: *Syngnathid Husbandry in Public Aquariums* (ed. By H. Koldewey), pp. 137. Project Seahorse, London, UK.
- Hjelmeland, K., Pedersen, B.H. & Nilssen E.M., 1998. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacean prey. *Marine Biology*, 98, 331–335.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VI–Peixes/1. ed. Brasília: MMA.
- Kaparapu, J., 2018. Application of microalgae in aquaculture. *Phykos*, 48, 21–26.
- Kline, M. D., Laidley, C. W., 2015. Development of intensive copepod culture technology for *Parvocalanus crassirostris*: Optimizing adult density. *Aquaculture*, 435, 128–136.
- Kokou, F.; Makridis, P.; Kentouri, M.; Divanach, P., 2012. Antibacterial activity in microalgae cultures. *Aquaculture Research*, 43, 1520–1527.
- Liu, X., Zhang, D., Lin, T., Li, S., 2023. Culturing low quality juveniles of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*. *Aquaculture Reports*, 30, 101561.
- Lourie, S. A., Vincent, A. C. J., & Hall, H. J., 1999. Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation. Project Seahorse.
- Martinez-Cardenas, L., Purser, G. J., 2007. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile potbellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). *Aquaculture*, 264, 92-100.
- Mélo, R. C. S., Santos, L.P.S., Brito, A.P.M., Gouveia, A.A., Marçal, C., Cavalli, R. O., 2016. Use of the microalga *Nannochloropsis oculata* in the rearing of newborn longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) juveniles. *Aquaculture Research*, 47, 3934-3941.
- Monteiro-Neto, C., Cunha, F.E.D.A., Nottingham, M.C., Araújo, M.E., Rosa, I.L., & Barros, G.M.L., 2003. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State. northeast Brazil. *Biodiversity & Conservation*. 12, 1287–1295.
- Moorhead, J. A., 2015. Research-scale tank designs for the larval culture of marine ornamental species, with emphasis on fish. *Aquacultural Engineering*, 64, 32-41.
- Mustafa, S., Estim, A., Shapawi, R., Shalehand, M. J., & Sidik, S. R. M., 2021. Technological applications and adaptations in aquaculture for progress towards sustainable development and seafood security. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 718, 12041.
- Naas, k., Naess, T., Harboe, T., 1992. Enhance first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in green water. *Aquaculture* 105, 143-156.
- Natrah, F.M.; Bossier, P.; Sorgeloos, P.; Yusoff, F.M.; Defoirdt, T., 2014. Significance of microalgal–bacterial interactions for aquaculture. *Rev. Aquaculture*, 6, 48–61.
- Naviner, M., Bergé, J. P., Durand, P., Le Bris, H., 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture*, 174, 15-24.

- Novelli, B., Socorro, J. A., Caballero, M. J., Otero-Ferrer, F., Segade-Botella, A., & Domínguez, L.M., 2015. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): Histological and histochemical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1233–1251.
- Novelli, B., Otero-Ferrer, F., Diaz, M., Socorro, J. A., Caballero, M. J., Domínguez, L. M., Moyano, F. J., 2016. Digestive biochemistry as indicator of the nutritional status during early development of the long snouted seahorse (*Hippocampus reidi*). *Aquaculture*, 464, 196–204.
- Ofelio, C., Díaz, A. O., Radaelli, G., & Planas, M., 2018. Histological development of the long-snouted seahorse *Hippocampus guttulatus* during ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 93, 72–87.
- Oie, G., Makridis, P., Reitan, K.I., Olsen, Y., 1997. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 153, 103-122.
- Olivotto, I., Avella, M.A., Sampaolesi, G., Piccinetti, C.C., Ruiz, P.N., & Carnevali, O., 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: rearing and feeding studies. *Aquaculture*, 283, 92–96.
- Olivotto, I., Planas, M., Simões, N., Holt, G. J., Avella, M.A., & Calado, R., 2011. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42, 135–166.
- Oliveira, T. & Pollom, R., 2017. *Hippocampus reidi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T10082A17025021
- Papandroulakis, N., Divanach, P., Kentouri, M., 2002. Enhanced biological performance of intensive sea bream (*Sparus aurata*) larviculture in the presence of phytoplankton with long photophase. *Aquaculture*, 204, 45-63.
- Palma, J., Bureau, D. P., Andrade, J. P., 2011. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, 318, 439–443.
- Palma, J., Bureau, D.P., Andrade, J.P., 2014. The effect of diet on ontogenic development of the digestive tract in juvenile reared long snout seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Fish Physiol. Biochem.*, 40, 739-750.
- Palmer, P.J., Burke, M.J., Palmer, C.J., Burke, J.B., 2007. Developments in controlled green-water larval culture technologies for estuarine fishes in Queensland, Australia and elsewhere. *Aquaculture*, 272, 1-21.
- Pham N.K. & Lin J., 2013. The effects of different feed enrichments on survivorship and growth of early juvenile longsnout seahorse, *Hippocampus reidi*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 44, 435–446.
- Randazzo, B., Rolla, L., Ofelio, C., Planas, M., Gioacchini, G., Vargas, A., Olivotto, I., 2018. The influence of diet on the early development of two seahorse species (*H. guttulatus* and *H. reidi*): Traditional and innovative approaches. *Aquaculture*, 490, 75–90.

- Reitan, K.I.; Rainuzzo, J.R.; Øie, G.; Olsen, Y., 1997. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155, 207-221.
- Sales, R., Mélo, R.C.S., Moraes Junior, R.M., da Silva, R.C.S., Cavalli, R.O., Navarro, D.M.D.A., Souza Santos, L.P., 2016. Production and use of a flocculated paste of *Nannochloropsis oculata* for rearing newborn seahorse *Hippocampus reidi*. *Algal Research*, 17, 142–149.
- Sales, R., de Souza-Santos, L.P., 2020. Production of concentrated inocula from the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Aquaculture International*, 28, 1609–1620.
- Silveira, R. B., Siccha-Ramirez, R., Silva, J. S., & Oliveira, C., 2014. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. *Zootaxa*, 3861, 317–332.
- Souza-Santos, L. P., Regis, C. G., Mélo, R. C., & Cavalli, R.O., 2013. Prey selection of juvenile seahorse *Hippocampus reidi*. *Aquaculture*, 404, 35–40.
- Souza, A.P, L. Ferreira, T. Mouriño, J. L. P. Martins, M. L., Magenta Magalhães, A. R., Tsuzuki, M. Y., 2020. Use of *Artemia* supplemented with exogenous digestive enzymes as sole live food increased survival and growth during the larviculture of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*. *Aquaculture Nutrition*, 26, 964–977.
- Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng*, 101, 87–96.
- Van der Meeren T.,1991. Algae as first food for cod larvae, *Gadus morhua* L.: filter feeding or ingestion by accident, *Journal Fish Biology*, 39, 225–237.
- Van der Meeren, T., Mangor- Jensen, J., Pikova, J., 2007. The effect of green water and light intensity on survival, grow the and lipid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*) during intensive rearing. *Aquaculture*, 1265, 206-277
- Willadino, L., Souza-Santos, L.P., Mélo, R.C.S., Brito, A.P., Barros, N.C.S., Araújo-Castro, C.M.V., Cavalli, R.O., 2012. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. *Aquaculture*, 360, 10–16.
- Wikfors, G.H.; Ohno, M., 2001. Impact of algal research in aquaculture. *Journal Phycology*, 37, 968–974.
- Woods, C.M.C., 2005. Growth of cultured seahorses (*Hippocampus abdominalis*) in relation to feed ration. *Aquaculture International*, 13, 305–314.

4. CONCLUSÕES GERAIS

No presente estudo, onde foi aplicada a técnica “água verde” (adição de microalgas na água de cultivo) durante os primeiros 15 dias de vida do cavalo-marinho *H. reidi* foi possível observar a importância desta técnica para a espécie através da sua influência na área de absorção do intestino e no desempenho zootécnico, gerando dados de suma importância para esta fase crítica do desenvolvimento da espécie.

A adição das microalgas, especificamente da *Tisochrysis lutea* nos tratamentos TISO (*Tisochrysis lutea*) e TIC (*Tisochrysis lutea* + *Chaetoceros muelleri*), mostrou-se uma alternativa vantajosa visto que sua inclusão resultou no aumento da área de absorção intestinal das larvas com 15 dias de vida, e por consequência melhorou o desempenho zootécnico (peso, taxa de crescimento específico e ganho de peso) das larvas.

No entanto, mais pesquisas são necessárias para identificar os mecanismos precisos responsáveis pelo aumento da área das vilosidades intestinais em uma cultura de “água verde”, assim como para avaliar o efeito de diferentes espécies e concentrações de microalgas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- BAILLY, N. *Hippocampus reidi*. Froese, R. and D. Pauly. Editors. (2008). FishBase. *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933. Accessed through: World Register of Marine Species at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=159446> on 2023-11-03.
- BULL, C.; SHEDD, J. G. Seahorse husbandry in public aquaria, 56 pp. **Discussion Group-Project Seahorse, Chicago**, 2002.
- CASTRO, A.L.; DINIZ, A.F.; MARTINS, I.Z.; VENDEL, A.L.; OLIVEIRA, T.P.R.; ROSA, I.M.L. Assessing diet composition of seahorses in the wild: *Hippocampus reidi* as a study-case. **Neotropical Ichthyology**, v. 6, p. 637-644, 2008.
- CABALLERO M.J., IZQUIERDO M.S., KJØRSVIK E., SOCORRO D.J.M., FERNANDEZ A.J, ROSENLUND, G. Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. **Aquaculture**, v. 225, p. 325-340, 2003.
- CAHU, C., INFANTE, J. Z., TAKEUCHI, T. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. **Aquaculture**, v. 227, p. 245-258, 2003.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna). Appendices I, II e III. www.cites.org. (Downloaded on 15 February 2020), 2014.
- COSTA NETO, E. M. Zotherapy based medicinal traditions in Brazil. **Honeybee**, v. 11, p. 2–4, 2000.
- FIGUEIREDO, J., LIN, J., ANTO, J., NARCISO, L. The consumption of DHA during embryogenesis as an indicative of the need to supply DHA during early larval development: a review. **Journal of Aquaculture Research and Development**, v. 3, p. 2–7, 2012.
- FOSTER, S. J. AND VINCENT, A. C. J. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 1–61, 2004.
- FOSTER, S.; WISWEDEL, S.; VINCENT, A. Opportunities and challenges for analysis of wildlife trade using CITES data—seahorses as a case study. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 26, p. 154–172, 2016.
- FRERET-MEURER, N. V.; ANDREATA, J. V.; ALVES, M. A. S. Activity rate of the seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (*Syngnathidae*). **Acta Ethologica**, v.15, p. 221– 227, 2012.
- FRERET–MEURER, N. V. et al. Population dynamics of the endangered seahorse *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 in a tropical rocky reef habitat. **Animal Biodiversity Conservation**, v. 41, p. 345-356, 2018.
- FREITAS, M. O.; VELASTIN, R. Ichthyofauna associated with a culture of mussel *Perna perna* in Northern Santa Catarina, Southern Brazil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 32, p. 31-37, 2010.
- GASPARINI, J. L. et al. Marine ornamental trade in Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 14, p. 2883–2899, 2005.

- GOMEZ-JURADO J. & GARDNER T. Slender seahorse *Hippocampus reidi*. In: *Syngnathid Husbandry in Public Aquariums* (ed. By H. Koldewey), pp. 137. Project Seahorse, London, UK, 2005
- GONÇALVES L.U., RODRIGUES A.P.O., MORO G.V., CARGNIN-FERREIRA E. & CYRINO J.E.P. Morfologia e Fisiologia do Sistema Digestório de Peixes, p.9. In: Fracalossi D.M. & Cyrino J.E.P. (Eds), *NUTRIAQUA: nutrição e alimentação de espécies de interesse para a aquicultura brasileira*. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis, SC, 2012.
- HARASTI, D.; GLADSTONE, W.; MARTIN-SMITH, K. M. Ontogenetic and sex-based differences in habitat preferences and site fidelity of the White's seahorse *Hippocampus whitei*. **Journal of Fish Biology**, v. 85, p. 1413–1428, 2014.
- HJELMELAND, K., PEDERSEN B.H., NILSSEN, E.M. Trypsin content in intestines of herring larvae, *Clupea harengus*, ingesting inert polystyrene spheres or live crustacean prey. **Marine Biology**, v. 98, p.331–335, 1998.
- HORA, M. D. S. C. DA; JOYEUX, J.-C. Closing the reproductive Cycle: Growth of the Seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from Birth to Adulthood under Experimental conditions **Aquaculture**, v. 292, p. 37–41, 2009.
- HORA, M. et al. Tolerance and growth of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* at different salinities. **Aquaculture**, v. 463, p. 1–6, 2016.
- HORA, M. DOS S. C. DA. et al. Effect of photoperiod and tank colour on growth and survival of pelagic-phase seahorse *Hippocampus reidi*. **Aquaculture Research**, v.48, p. 4300-4307, 2017.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília: ICMBio. 4162 p, 2018.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. URL. <http://www.redlist.org> (accessed 15.2.2020), 2019.
- KAWAGUCHI, M. et al. Morphology of brood pouch formation in the pot-bellied seahorse *Hippocampus abdominalis*. **Zoological letters**, v. 3, p. 1–16, 2017.
- KOLDEWEY, H.J., MARTIN-SMITH, K.M. A global review of seahorse aquaculture. **Aquaculture**. v. 302, p.131–152, 2010.
- KOKOU, F.; MAKRIDIS, P.; KENTOURI, M.; DIVANACH, P. Antibacterial activity in microalgae cultures. **Aquaculture Research**, v.43, p.1520–1527, 2012.
- LAKSANAWIMOL, P.; DAMRONGPHOL, P.; KRUATRACHUE, M. Alteration of the brood pouch morphology during gestation of male seahorses, *Hippocampus kuda*. **Marine and Freshwater Research**, v. 57, p. 497–502, 2006.
- LAZO J.P, MENDOZA R, HOLT G.J, AGUILERA C, ARNOLD C.R. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v.265, p.194–205, 2007.

LEAL, Miguel Costa et al. Marine ornamental fish imports in the European Union: an economic perspective. **Fish and Fisheries**, v. 17, p. 459-468, 2016.

LEE C.S., OSTROWSKI, A.CTY. Current status of marine finfish larviculture in the United States. **Aquaculture.**, v. 200, p. 89-100, 2001.

LENOIR, D. S. et al. Effects of first feeding on survival, growth and lipid composition of short-snouted seahorse juveniles, *Hippocampus hippocampus*, (Linnaeus). Book of **Abstracts XIII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding**, p. 315, 2008.

LINTON, J. R.; SOLOFF, B. L. The physiology of the brood pouch of the male seahorse *Hippocampus erectus*. **Bulletin of Marine Science**, v. 14, p. 45–61, 1964.

LIU, X., ZHANG, D., LIN, T., LI, S. Culturing low quality juveniles of the lined seahorse, *Hippocampus erectus*. **Aquaculture Reports**, v.30, p.10156, 2023.

LOURIE, S. A.; VINCENT, A. C. J.; HALL, H. J. **Seahorses: an identification guide to the world's species and their conservation**. [s.l.] Project Seahorse, 1999.

LOURIE, S. A. et al. A guide to the identification of seahorses. **Project Seahorse and TRAFFIC North America**, v. 114, 2004.

LOVETT, J.M. An introduction to the biology of the seahorse *Hippocampus abdominalis*. University of Tasmania, Launceston, 1969.

LUND, I., SKOV, P. V., HANSEN, B. W. Dietary supplementation of essential fatty acids in larval pikeperch (Sander lucioperca); short and long term effects on stress tolerance and metabolic physiology. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.162, p.340-348,2012.

MAI, A. C. G.; DE LUCENA ROSA, I. M. Ecological aspects of the seahorse *Hippocampus reidi* in the Camurupim/Cardoso estuary, Piauí State, Brazil, as subsidies for the implementation of an Environmental Protection Area. **Biota Neotropical**, v. 9, p. 85–91, 2009.

MARTINEZ-CARDENAS, L., PURSER, G. J. Effect of tank colour on *Artemia* ingestion, growth and survival in cultured early juvenile potbellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). **Aquaculture**, v. 264, p. 92-100, 2007.

MÉLO, R. C. S., SANTOS, L.P.S., BRITO, A.P.M., GOUVEIA, A.A., MARÇAL, C., CAVALLI, R. O. Use of the microalga *Nannochloropsis oculata* in the rearing of newborn longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) juveniles. **Aquaculture Research**, v. 47, p. 3934-3941, 2016

MONTEIRO NETO, C. et al. Analysis of the marine ornamental fish trade at Ceará State, northeast Brazil. **Biodiversity & Conservation**, v. 12, p. 1287–1295, 2003.

NAAS, K., NAESS, T., HARBOE, T. Enhance first feeding of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus*) in green water. **Aquaculture**, v.105, p.143-156, 1992.

NATRAH, F.M.; BOSSIER, P.; SORGELOOS, P.; YUSOFF, F.M.; DEFOIRD, T. Significance of microalgal–bacterial interactions for aquaculture. **Rev. Aquaculture**.v.6, p. 48–61, 2014.

- NOVELLI, B.; SOCORRO, J.A.; CABALLERO, M.J.; OTEROFERRER, F.; SEGADÉ-BOTELLA, A.; MOLINA DOMINGUEZ, L. Development of seahorse (*Hippocampus reidi*, Ginsburg 1933): histological and histochemical study. *Fish Physiology and Biochemistry*, v.41, p.1233–1251, 2015.
- OIE, G., MAKRIDIS, P., REITAN, K.I., OLSEN, Y. Protein and carbon utilization of rotifers (*Brachionus plicatilis*) in first feeding of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, v. 153, p.103-122, 1997.
- OLIVEIRA, T. & POLLOM, R. *Hippocampus reidi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T10082A17025021, 2017.
- OLIVOTTO, I. et al. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture*. v. 283, p. 92– 96, 2008.
- OLIVOTTO, I., PLANAS, M., SIMÕES, N., HOLT, G.J., AVELLA, M.A., CALADO, R. Advances in breeding and Rearing Marine Ornamentals. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.42, p.135-166, 2011.
- PHAM N.K. & LIN J. The effects of different feed enrichments on survivorship and growth of early juvenile longsnout seahorse, *Hippocampus reidi*. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.44, p. 435–446, 2013.
- PALMA, J., BUREAU, D. P., ANDRADE, J. P. Effect of different *Artemia* enrichments and feeding protocol for rearing juvenile long snout seahorse, *Hippocampus guttulatus*. *Aquaculture*, v. 318, p. 439–443, 2011.
- PALMA, J., BUREAU, D.P., ANDRADE, J.P. The effect of diet on ontogenic development of the digestive tract in juvenile reared long snout seahorse *Hippocampus guttulatus*. *Fish Physiology Biochemistry*, v. 40, p. 739-750, 2014.
- PALMTAG, M. R. The marine ornamental species trade. *Marine ornamental species aquaculture*, p. 3–14, 2017.
- PALMER, P.J., BURKE, M.J., PALMER, C.J., BURKE, J.B. Developments in controlled green-water larval culture technologies for estuarine fishes in Queensland, Australia and elsewhere. *Aquaculture*, v. 272, p.1-21, 2007.
- PAPANDROULAKIS, N., DIVANACH, P., KENTOURI, M. Enhanced biological performance of intensive sea bream (*Sparus aurata*) larviculture in the presence of phytoplankton with long photophase. *Aquaculture*, v. 204, p. 45-63, 2002.
- PAYNE, M.F.; RIPPINGALE, R.J. Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched *Artemia*. *Aquaculture*, v. 188, p. 353–361, 2000.
- RANDAZZO, B. et al. The influence of diet on the early development of two seahorse species (*H. guttulatus* and *H. reidi*): Traditional and innovative approaches. *Aquaculture*, v. 490, p. 75–90, 2018.
- REITAN, K.I.; RAINUZZO, J.R.; ØIE, G.; OLSEN, Y. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae, *Aquaculture*, v.155, p. 207-221, 1997.

ROSA, I.L.; DIAS, T.L.; BAUM, J.K. Threatened fishes of the world: *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 (Syngnathidae). **Environmental Biology of Fishes**, v.64, p.378, 2002.

ROSA, I. L., ALVES, R.R.N., BONIFÁCIO, K.M., MOURÃO, J.S., OSÓRIO, F.M., OLIVEIRA, T.P.R., & NOTTINGHAM, M.C. Fishers' knowledge and seahorse conservation in Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.1, p.1–15, 2005.

ROSA, I. L.; SAMPAIO, C. L. S.; BARROS, A. T. Collaborative monitoring of the ornamental trade of seahorses and pipefishes (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil: Bahia State as a case study. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, p. 247–252, 2006.

ROSA, I. L. et al. Population characteristics, space use and habitat associations of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei: Syngnathidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 405–414, 2007.

ROSA, I. L., OLIVEIRA, T. P. R., OSORIO, F. M., MORAES, L. E., CASTRO, A. L. C., BARROS, G. M. L., & ALVES, R. R. N. Fisheries and trade of seahorses in Brazil: Historical perspective, current trends, and future directions. **Biodiversity and Conservation**, v.20, p.1951–1971, 2011.

SILVEIRA, R. B. Comportamento reprodutivo e desenvolvimento inicial de *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 em laboratório. **Biociências**, v. 8, p. 115-122, 2000.

SILVEIRA, R. B. Dinâmica populacional do cavalo-marinho *Hippocampus reidi* no manguezal de Maracaípe, Ipojuca, Pernambuco, Brasil. 2005. Tese (Doutorado em zoologia). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005.

SILVEIRA, R.B. et al. Morphological and molecular evidence for the occurrence of three *Hippocampus* species (Teleostei: Syngnathidae) in Brazil. **Zootaxa**, v. 3861, p. 317-332, 2014.

SILVEIRA, R. B.; SILVA, J. R. S.; FERREIRA, N. F. Reproductive period, average height for the development of the brood pouch and sexual maturation of the seahorse *Hippocampus reidi* (Syngnathidae) in the northeast of Brazil. **Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary**, v. 3, p. 140-52, 2016.

SOUZA, A.P., L. FERREIRA, T. MOURIÑO, J. L. P. MARTINS, M. L., MAGENTA MAGALHÃES, A. R., & TSUZUKI, M. Y. Use of *Artemia* supplemented with exogenous digestive enzymes as sole live food increased survival and growth during the larviculture of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*. **Aquaculture Nutrition**, v. 26, p. 964–977, 2020.

SORGELOOS, P., DHERT, P., CANDREVA, P. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. **Aquaculture**, v. 200, p. 147–159, 2001.

STORERO L. P.; GONZÁLEZ, R. A. Feeding habits of the seahorse *Hippocampus patagonicus* in San Antonio Bay (Patagonia, Argentina). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 88, p. 1.503-1.508, 2008.

STUART, K.R., DRAWBRIDGE, M. The effect of light intensity and green water on survival and growth of cultured larval California yellowtail (*Seriola lalandi*). **Aquaculture**, v. 321, p. 152–156, 2011.

- TEIXEIRA, R. L.; MUSICK, J. Reproduction and food habits of the lened *Hippocampus erectus* (TELEOSTEI: SYNGNATHIDAE) of Chesapeake Bay. **Revista Brasileira Biologia**, v.61, n.1, p.79-90, 2001.
- VARI, R.P. Fishes of the Western North Atlantic, subfamily Hippocampinae. The seahorses. Sears Found. Mar. Res. Memoir, Yale University. New heaven, v.1, p.173-189, 1982.
- VAN DER MEEREN, T., MANGOR- JENSEN, J., PIKOVA, J. The effect of green water and light intensity on survival, grow the and lipid composition in Atlantic cod (*Gadus morhua*) during intensive rearing. **Aquaculture**. v. 265, p. 206-277, 2007.
- VILLENEUVE, L., GISBERT, E., ZAMBONINO-INFANTE1, J. L., QUAZUGUEL, P., CAHU, C. L. Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: implication of retinoid receptors. **British Journal of Nutrition**, v. 94, p. 877–884, 2005.
- WHITTINGTON, C. M.; FRIESEN, C. R. The evolution and physiology of male pregnancy in syngnathid fishes. **Biological Reviews**, v. 95, p. 1252–1272, 2020.
- WILLADINO, L., SOUZA-SANTOS, L. P., MÉLO, R. C. S., BRITO, A. P., BARROS, N. C. S., ARAÚJO-CASTRO, C. M. V., CAVALLI, R. O. Ingestion rate, survival and growth of newly released seahorse *Hippocampus reidi* fed exclusively on cultured live food items. **Aquaculture**, v. 360, p. 10–16, 2012.
- WOOD, E. Collection of coral reef fish for aquaria: global trade, conservation issues and management strategies. **Marine Conservation Society**, Herefordshire, UK, 2001.
- WOODS, C. M. C. Growth of cultured seahorses (*Hippocampus abdominalis*) in relation to feed ration. **Aquaculture International**, v.13, p. 305–314, 2005.
- ZAMBONINO, J. L. I., CAHU, C.L. High Dietary Lipid Levels Enhance Digestive Tract Maturation and Improve *Dicentrarchus labrax* Larval Development. **The Journal of Nutrition**, v.129, p. 1195–1200, 1999.

APÊNDICES

Figura 1: Casal de reprodutores utilizados para executar a larvicultura do experimento



Figura 2: Cultivo das culturas de microalgas



Figura 3: Sistema de manutenção da larvicultura



Figura 4: Sistema de filtragem da larvicultura



Figura 5: Cavalos-marinhos nos seus respectivos tratamentos: A- TSM, B- TISO, C- TCHO, D- TIC

